

10/500 (361)

Rec 6 PCT/PTC 28 JUN 2004

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003 年 7 月 10 日 (10.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/055903 A1

- (51) 国際特許分類: C07K 7/06, 央第 6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).  
7/08, C12N 15/29, A01H 1/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/13443 (74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5 森ビル 3階 Tokyo (JP).
- (22) 国際出願日: 2002 年 12 月 24 日 (24.12.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (30) 優先権データ:  
特願 2001-395488 2001 年 12 月 26 日 (26.12.2001) JP  
特願 2001-395487 2001 年 12 月 26 日 (26.12.2001) JP  
特願 2002-160671 2002 年 5 月 31 日 (31.05.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高木 優 (TAK-AGI, Masaru) [JP/JP]; 〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1 つくば中央第6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 平津 圭一郎 (HIRATSU, Keiichirou) [JP/JP]; 〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1 つくば中
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: TRANSCRIPTION REGULATORY GENE AND PEPTIDE

(54) 発明の名称: 転写抑制遺伝子及びペプチド

(57) **Abstract:** A peptide or a protein capable of converting a transcriptional factor into a transcription regulator; a gene encoding the above peptide or protein; a chimeric protein wherein the above peptide or protein is bonded to a transcriptional factor; a chimeric gene wherein a gene encoding the above peptide or protein is bonded to another gene encoding a transcriptional factor; a recombinant vector having the chimeric gene; and a transformant containing the recombinant vector. Because of having an extremely short length, the above-described peptide capable of converting a transcriptional factor into a transcription regulator can be very easily synthesized and makes it possible to efficiently regulate the transcription targeting a specific gene alone. Owing to these characteristics, this peptide is widely applicable and useful in, for example, regulating the expression of an oncogene and regulating the expression of a gene encoding an enzyme in a pigment metabolism system.

[続葉有]

BEST AVAILABLE COPY

WO 03/055903 A1



---

(57) 要約:

本発明は、転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するペプチド又はタンパク質、該ペプチド又はタンパク質をコードする遺伝子、該ペプチド又はタンパク質と転写因子とが連結したキメラタンパク質、該ペプチド又はタンパク質をコードする遺伝子と転写因子をコードする遺伝子とが連結したキメラ遺伝子、該キメラ遺伝子を有する組み換えベクター、及び該組み換えベクターを含む形質転換体に関する。

本発明の転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するペプチドは、極めて短いサイズであるため、その合成は極めて簡単であり、特定の遺伝子のみを標的にした転写抑制を効率的に行うことができるので、ガン遺伝子の発現の抑制、色素代謝系の酵素をコードする遺伝子の発現を制御など、極めて広範な分野において適用可能でかつ有用である。

## 明 細 書

## 転写抑制遺伝子及びペプチド

## 技術分野

本発明は、転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するペプチド又はタンパク質、該ペプチド又はタンパク質をコードする遺伝子、該ペプチド又はタンパク質と転写因子とが連結したキメラタンパク質、該ペプチド又はタンパク質をコードする遺伝子と転写因子をコードする遺伝子とが連結したキメラ遺伝子、該キメラ遺伝子を有する組み換えベクター、及び該組み換えベクターを含む形質転換体に関する。

## 背景技術

これまで生体遺伝子のmRNAへの転写を抑制又は該遺伝子の発現を抑制する手段として、アンチセンス法又はリボザイム法が知られており、これらは、例えば、発癌遺伝子等疾病の原因となる遺伝子の発現の抑制又は植物の改良等への利用に関して研究が進められている。アンチセンス法では、転写を抑制しようとする標的遺伝子又はこれを転写したmRNA等の特定部位と相補的なアンチセンスDNA又はRNAが用いられるが、調製されたアンチセンスDNA又はRNAは該標的遺伝子以外の遺伝子の発現抑制には使用できず、他の標的遺伝子に対してはその配列に合わせて新たにアンチセンスDNA又はRNAを調製する必要がある。一方、リボザイム法では、標的DNA又はmRNAをリボザイムにより切断するには、該標的DNA又はmRNAと結合するための相補的な配列を有し、かつ所定位置で切断可能なようにリボザイムを設計する必要がある。また、標的遺伝子を切断するように設計されたリボザイムであっても、例えば、これを、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター等のプロモーター及び転写終結配列に連結して導入ベクターを構築し、実際に植物細胞中に導入すると、転写されたリボザイムに余分な配列が付加されてリボザイム活性が失われる場合がある。また、これらの従来技術においては、当然のことながら標的遺伝子の特定、塩基

配列の決定が不可欠となっていた。このほか、遺伝子ノックアウト法により遺伝子の発現を抑える方法もあるが、この方法によっては例えば複2倍体植物においては適用ができなかった。

一方、上記従来技術とは全く別のアプローチとして、本発明者等は、シロイヌナズナ由来のAtERF3、AtERF4、AtERF7、及びAtERF8タンパク質を転写因子に結合させたタンパク質が遺伝子の転写を顕著に抑制するとの知見を得た。そこで、上記タンパク質をそれぞれコードする遺伝子及びこれから切り出したDNAを含むエフェクタープラスミドを構築し、これを植物細胞に導入することにより、実際に遺伝子の転写を抑制することに成功した（特開2001-269177号、2001-269178号、2001-292776号、及び2001-292777号公報）。さらに、本発明者等は、Class II ERF(ethylene responsive element binding factor) 遺伝子群の一つであるタバコERF3（特開平2001-269176号公報）、イネOsERF3タンパク質をコードする遺伝子（特開平2001-269179号公報）、及びZnフィンガータンパク（Zinc Finger Protein）の遺伝子群の一つであるシロイヌナズナZAT10、同ZAT11をコードする遺伝子についてもまた、上記と同様な試験を行ったところ、遺伝子の転写を抑制することを見い出している。そして、これらの遺伝子の塩基配列はまちまちではあるが、これらの遺伝子がコードするタンパク質又はペプチドには、(L/F)DLN(L/F)(X)Pなる共通のモチーフ（但し、Xは、任意のアミノ酸残基を表す。）が存在することを明らかにした（The Plant Cell, Vol.13, 1959-1968, August, 2001）。

従って、本発明の課題は、従来のアンチセンス法又はリボザイム法のように標的遺伝子の塩基配列に合わせてその都度DNA又はRNAの設計を行う必要がなく、簡便でかつ広く適用可能な遺伝子の転写抑制手段を提供することにある。また、本発明のもう一つの課題は、上記転写抑制タンパク質に関する研究をさらに進めて、遺伝子の転写抑制を行う場合において実際に必要となる最も基本的なアミノ酸配列部分を確定し、遺伝子の転写抑制をさらに簡便に行うためのペプチド及びその遺伝子を提供することにある。

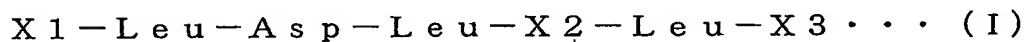


## 発明の開示

本発明者等は、上記課題を解決するため、上記の共通のモチーフを有するタンパク質について鋭意研究の結果、遺伝子の転写を抑制するタンパク質は極めて単純な構造のペプチドであってもよく、これら単純な構造を有するペプチドが、転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するという驚くべき発見をした。本発明者等はまた、シロイヌナズナ SUPERMAN（以下、SUP という場合がある。）タンパク質は、上記の共通のモチーフと一致しないモチーフを有するが、転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有すること、また該 SUPERMAN タンパク質をコードする遺伝子を、転写因子をコードする遺伝子に結合させたキメラ遺伝子は、強力な転写抑制能を有するタンパク質を産生することを見出し、本発明を完成するに至った。

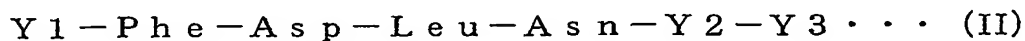
すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

（１）下記式（Ⅰ）で表されるアミノ酸配列を有し、かつ転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するペプチド。



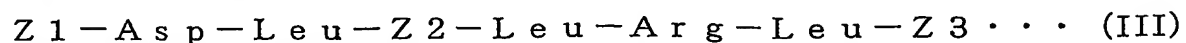
（式中、X1は0～10個のアミノ酸残基を表し、X2はAsn又はGluを表し、X3は少なくとも6個のアミノ酸残基を表す。）

（２）下記式（Ⅱ）で表されるアミノ酸配列を有し、かつ転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するペプチド。



（式中、Y1は0～10個のアミノ酸残基を表し、Y2はPhe又はIleを表し、Y3は少なくとも6個のアミノ酸残基を表す。）

（３）下記式（Ⅲ）で表されるアミノ酸配列を有し、かつ転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するペプチド。



（式中、Z1はLeu又はAsp-Leu又はLeu-Asp-Leuを表し、Z2はGlu又はGln又はAspを表し、Z3は0から10個のアミノ酸残基を表す。）

（４）Asp-Leu-Z4-Leu-Arg-Leuで表されるアミノ酸配列

を有し、かつ転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するペプチド。

(式中、Z 4はG l u又はG l n又はA s pを表す。)

(5) 以下の(a)から(d)のいずれかのアミノ酸配列を有し、かつ転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するタンパク質

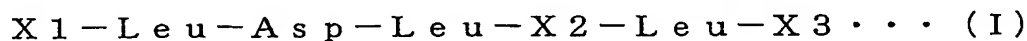
(a) 配列番号31に示すアミノ酸配列

(b) 配列番号31に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列

(c) 配列番号61に示すアミノ酸配列

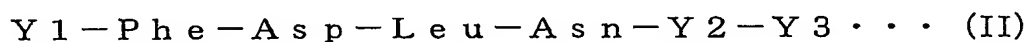
(d) 配列番号61に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列

(6) 下記式(I)で表されるアミノ酸配列を有し、かつ転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するペプチドをコードする遺伝子。



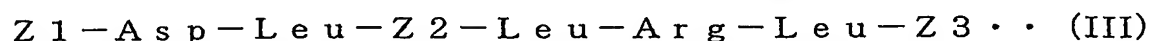
(式中、X1は0～10個のアミノ酸残基を表し、X2はA s n又はG l uを表し、X3は少なくとも6個のアミノ酸残基を表す。)

(7) 下記式(II)で表されるアミノ酸配列を有し、かつ転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するペプチドをコードする遺伝子。



(式中、Y1は0～10個のアミノ酸残基を表し、Y2はP h e又はI l eを表し、Y3は少なくとも6個のアミノ酸残基を表す。)

(8) 下記式(III)で表されるアミノ酸配列を有し、かつ転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するペプチドをコードする遺伝子。



(式中、Z1はL e u又はA s p - L e u又はL e u - A s p - L e uを表し、Z2はG l u又はG l n又はA s pを表し、Z3は0から10個のアミノ酸残基を表す。)

(9) A s p - L e u - Z4 - L e u - A r g - L e uで表されるアミノ酸配列を有し、かつ転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するペプチドをコードする遺伝子。

(式中、Z 4 は G l u 又は G l n 又は A s p を表す。)

(10) 以下の(a)から(d)のいずれかのアミノ酸配列を有し、かつ転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するタンパク質をコードする遺伝子。

(a) 配列番号 31 に示すアミノ酸配列

(b) 配列番号 31 に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列

(c) 配列番号 61 に示すアミノ酸配列

(d) 配列番号 61 に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列

(11) 上記(1)から(5)のいずれかのペプチド又はタンパク質をコードする部分を含み、その両端部に制限酵素部位を有する二本鎖 DNA。

(12) 上記(1)から(5)のいずれかのペプチド又はタンパク質と転写因子とを連結したキメラタンパク質。

(13) 上記(6)から(10)のいずれかの遺伝子と転写因子をコードする遺伝子とを連結したキメラ遺伝子。

(14) 上記(13)のキメラ遺伝子を有する組み換えベクター。

(15) 上記(14)の組み換えベクターを含む形質転換体。

(16) 上記(14)の組み換えベクターを含む植物。

#### 図面の簡単な説明

図1は、試験対象の各種DNA断片を含む GAL4DB-RD エフェクタープラスミドを構築する手順を示す図である。

図2は、レポーター遺伝子 p35S-GAL4-LUC を構築する手順の前半部を示す図である。

図3は、上記レポーター遺伝子 p35S-GAL4-LUC を構築する手順の後半部を示す図である。

図4Aは、リポーター遺伝子とエフェクタープラスミドを示す図である。

なお、図1から4A中、5XGAL4: GAL4 転写因子 DNA 結合配列、TATA: CaMV35S プロモーターTATA ボックスを含む領域、LUC: ルシフェラーゼ遺伝子、CaMV 35S:

カリフラワーモザイクウイルス 35S タンパク質遺伝子プロモーター、GAL4DB:酵母 GAL4 転写因子 DNA 結合ドメインコード領域、Nos:ノパリン合成酵素遺伝子転写終止領域を表す。

図 4 B は、pGAL4DB に結合した各種ペプチドがリポーター遺伝子の活性 (Relative Activity) に及ぼす影響を示す図である。図中、右側のグラフは、各種 DNA 断片を有するエフェクタープラスミドを導入したときのリポーター遺伝子の活性を示す (エフェクターを入れないときのリポーター遺伝子の活性を 100 とした)。

図 5 は、エフェクタープラスミド pGAL4DB-SUP の構築手順を示す図である。

図 6 は、エフェクタープラスミド pAtERF5 の構築手順を示す図である。

図 7 は、レポータープラスミド pGAL4-GCC-LUC の構築手順の前半部を示す図である。

図 8 は、レポータープラスミド pGAL4-GCC-LUC の構築手順の後半部を示す図である。

図 9 A は、転写抑制試験において、レポーター遺伝子としてプラスミドに組み込まれた 35S-GAL4-LUC の構造及びエフェクター遺伝子として組み込まれた SUP (D) の構造の概略を示す図である。

図 9 B は SUP 遺伝子及びその断片による 転写抑制試験の結果を示す図である。

図 10 A は、転写抑制試験において、レポーターとして使用した GAL4-GCC-LUC の構造、及び AtERF5、GAL4DB、GAL4DB-SUP、GAL4DB175/204SUP を組み込んで構築されたエフェクター遺伝子の構造の概略を示す図である。

図 10 B は各エフェクターによる転写抑制試験の結果を示す図である。

図 11 は、SUP 遺伝子及び ERF3 遺伝子による EIN3 の転写活性化機能の抑制効果を、エチレン前駆体存在下における植物体の茎長及び根の伸長程度により調べた結果を示す写真である。

図 12 は、SUP 遺伝子及び ERF3 遺伝子による植物体における EIN3 の転写活性化機能の抑制効果をエチレン存在下における植物体成長の程度により調べた結果を示す写真である。

図 13 は、SUP 遺伝子及び ERF3 遺伝子による、エチレン存在下での PDF1.2、

BCHN 及び ERF1 遺伝子の発現抑制効果を、これらエチレン誘導性遺伝子の発現を示す mRNA の検出の有無を指標にノーザンブロットハイブリダイゼーションにより調べた結果を示す写真である。

図 1 4 は、シロイヌナズナ植物体を形質転換するためのプラスミド p35S::CUC1SRD の構造を示す模式図である。

図 1 5 は、野生型 (Col-0)、cuc1/cuc2 二重変異体 (cuc1/cuc2) 及び p35S::CUC1SRD で形質転換された植物体 (35S::CUC1SRD) について各発芽後 5 日から 10 日目の葉体の子葉部を撮影した写真である。

図 1 6 は、pEIN3SRD1 によるシロイヌナズナ植物形質転換体 (35S::EIN3SRD1)、及び EIN3RD1 による同形質転換体 (35S::EIN3RD1) においてエチレン存在下で観察された植物体の茎及び根の形態を示す写真である。

図 1 7 は、pEIN3SRD1 によるシロイヌナズナ植物形質転換体 (35S::EIN3SRD1)、及び EIN3RD1 による同形質転換体 (35S::EIN3RD1) においてエチレン存在下で観察された植物体成長の程度を示す写真である。

図 1 8 A は、p35S::PAP1SRDX 形質転換シロイヌナズナ植物及び野生株を 3 % ショ糖含有 MS 培地で生育させた各発芽体の写真である。

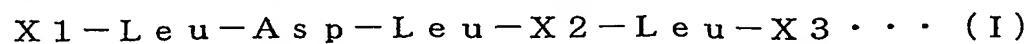
図 1 8 B は、上記植物体における DFR 遺伝子の発現を RT-PCR 法により解析した結果を示す電気泳動写真である。

図 1 9 A は、p35S::AtMYB23SRDX 形質転換シロイヌナズナ植物及び野生株の葉を撮影した写真である。

図 1 9 B は、上記植物体におけるトリコーム発生遺伝子の発現を RT-PCR 法により解析した結果を示す電気泳動写真である。

以下、本発明をさらに詳細に説明する。

本発明においては、下記式 (I) で表されるアミノ酸配列を有し、かつ転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するペプチドが提供される。



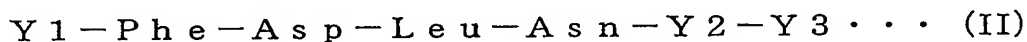
(式中、X1 は 0 ~ 10 個のアミノ酸残基を表し、X2 は Asn 又は Glu を表し、X3 は少なくとも 6 個のアミノ酸残基を表す。)

上記式 (I) 中、X 1 についてアミノ酸残基の数は 0 ～ 10 個であればよいが、使用するペプチドの合成のし易さからみれば、短い方がよく、好ましくは 10 個以下、より好ましくは 5 個以下である。

また、X 3 のアミノ酸残基の数は重要であるが、驚くべきことに最低 6 個あれば上記機能を示すことが見いだされた。さらに、これら X 1 及び X 3 においてはアミノ酸の種類はどのようなものであってもよく、例えば、X 3 については、上記従来技術に示したペプチドの共通モチーフ (L/F) D L N (L/F) (X) P のうち P (プロリン) は必要なく、単にアラニンを並べたものであってもよい。

これに対して、L D L N L (Leu-Asp-Leu-Asn-Leu)、又は L D L N (Leu-Asp-Leu-Asn) のみの配列では上記機能を示さず、また、X 2 については 5 個又は 6 個のアミノ酸残基を有するよう設計したものは、極めて顕著な上記機能を示すのに対して 3 個のアミノ酸残基を有するよう設計したものは上記機能を示さない。

本発明においてはまた、下記式 (II) で表されるアミノ酸配列を有し、かつ転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するペプチドが提供される。

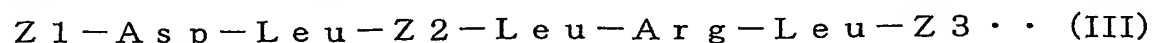


(式中、Y 1 は 0 ～ 10 個のアミノ酸残基を表し、Y 2 は P h e 又は I l e を表し、Y 3 は少なくとも 6 個のアミノ酸残基を表す。)

上記式 (II) 中、Y 1 についてアミノ酸残基の数は 0 ～ 10 個であればよいが、使用するペプチドの合成のし易さからみれば、短い方がよく、好ましくは 10 個以下、より好ましくは 5 個以下である。

また、Y 3 のアミノ酸残基の数も、最低 6 個あれば上記機能を示すことが見いだされた。さらに、これら Y 1 及び Y 3 においてはアミノ酸の種類はどのようなものであってもよい。

本発明においてはさらに、下記式 (III) で表されるアミノ酸配列を有し、かつ転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するペプチドが提供される。



(式中、Z 1 は L e u 又は A s p - L e u 又は L e u - A s p - L e u を表し、Z 2 は G l u 又は G l n 又は A s p を表し、Z 3 は 0 ～ 10 個のアミノ酸残基を表す。)

上記式 (III) 中、Z 3 についてアミノ酸残基の数は 0 ～ 10 個であればよいが、使用するペプチドの合成のし易さからみれば、短い方がよく、好ましくは 10 個以下、より好ましくは 5 個以下である。Z 3 の具体例としては、例えば G、G F F、G F A、G Y Y、A A A 等が挙げられるが、これらに限定はされない。上記 (III) で表されるペプチドは、従来技術に示したペプチドの共通モチーフ (L / F) D L N (L / F) (X) P とは異なる D L E L R L なるモチーフを有し、これは SUP タンパク質の 196 ～ 201 番目のアミノ酸配列 (Asp-Leu-Glu-Leu-Arg-Leu) に相当する。全ペプチド数はペプチド合成のし易さからみれば、多くても合計で 20 アミノ酸以下のものが望ましい。例えば下記の各ペプチドが例示される。

Leu-Asp-Leu-Glu-Leu-Arg-Leu、

Leu-Asp-Leu-Glu-Leu-Arg-Leu-Gly、

Leu-Asp-Leu-Glu-Leu-Arg-Leu-Ala-Ala-Ala

Leu-Asp-Leu-Glu-Leu-Arg-Leu-Gly-Phe-Ala

Asp-Leu-Asp-Leu-Glu-Leu-Arg-Leu-Gly-Phe-Ala

Leu-Asp-Leu-Asp-Leu-Glu-Leu-Arg-Leu-Gly-Phe-Ala

さらに、本発明の転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するペプチドとしては、Asp-Leu-Glu-Leu-Arg-Leu なる最小配列を有するペプチドであってもよい。

上記のペプチドにおいて、最小配列部分のグルタミン酸 (E) はグルタミン (Q) 又はアスパラギン酸 (D) に置き換えたものでもよく、例えば、Leu-Asp-Leu-Gln-Leu-Arg-Leu-Gly-Tyr-Tyr、Asp-Leu-Asp-Leu-Arg-Leu なるペプチドの転写抑制効果も極めて優れている。これに対して、Leu-Glu-Leu-Arg-Leu なる配列では転写抑制機能がない。

以上のことから、上記式 (I) から (III) で表されるペプチドにおいて、転写因子を転写抑制因子に変換する機能を発揮するために必要な最小限のペプチドのアミノ酸残基の数は、わずか 5 から 6 個にすぎない。

さらに、本発明においては、以下の (a) から (d) のいずれかのアミノ酸配列を有し、かつ転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するタンパク質が提供さ

れる。

- (a) 配列番号 3 1 に示すアミノ酸配列
- (b) 配列番号 3 1 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列
- (c) 配列番号 6 1 に示すアミノ酸配列
- (d) 配列番号 6 1 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列

上記の「配列番号 3 1（又は配列番号 6 1）に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列」における「1 から数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、1 から 20 個、好ましくは 1 から 10 個、より好ましくは 1 から 7 個、さらに好ましくは 1 から 5 個、特に好ましくは 1 から 3 個程度を意味する。

上記アミノ酸の欠失、置換若しくは付加は、上記タンパク質をコードする遺伝子を、当該技術分野で公知の手法によって改変することによって行うことができる。遺伝子に変異を導入するには、Kunkel 法又は Gapped duplex 法等の公知手法又はこれに準ずる方法により行うことができ、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えば Mutant-K (TAKARA 社製) や Mutant-G (TAKARA 社製)）などを用いて、あるいは、TAKARA 社の LA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキットを用いて変異が導入される。

配列番号 3 1 に示されるアミノ酸配列を有する SUP タンパク質及びそれをコードする遺伝子はそれ自体公知である。該アミノ酸配列の 195 ～ 199 番目の配列（塩基配列の 583 ～ 597 に相当）は、ロイシン（L）－アスパラギン酸（D）－ロイシン（L）－グルタミン酸（E）－ロイシン（L）であり、また、この配列の 3 末端下流側にはプロリン残基を含まず、上記従来技術に示した（L / F）DLN（L / F）（X）P なるモチーフとは異なるアミノ酸配列を有する。

また、本発明において転写因子を転写抑制因子に変換するために使用されるタンパク質は、配列番号 3 1 に示されるアミノ酸配列の全長配列を有するタンパク質に限られず、その部分配列を有するタンパク質又はペプチドであってもよい。

その部分配列を有するタンパク質としては、例えば、配列番号 6 1 に示される



アミノ酸配列（SUPタンパク質の175～204番目のアミノ酸配列）を有するタンパク質が挙げられ、その部分配列を有するペプチドとしては、上記（III）で表されるペプチドが挙げられる。

本発明によればまた、上記のいずれかのペプチド又はタンパク質をコードする遺伝子が提供される。

本発明においては、上記のいずれかのペプチド又はタンパク質と転写因子とが連結したキメラタンパク質；上記のいずれかのペプチド又はタンパク質をコードする遺伝子と転写因子をコードする遺伝子とが連結したキメラ遺伝子も提供される。このキメラ遺伝子を含む組み換えベクターを用いて形質転換した形質転換体においては、該キメラ遺伝子に対応するキメラタンパク質が生成される。このキメラタンパク質における転写因子由来のDNA結合領域は標的遺伝子と結合するが、この場合、転写因子の機能は、転写抑制機能に変換され、該標的遺伝子の転写が抑制され、標的遺伝子の発現は起こらない。

本発明のキメラタンパク質による転写抑制機能は遺伝子の種類を問わず作用する。本発明のキメラタンパク質の転写抑制機能は標的遺伝子との結合が必要であるから、上記のペプチド又はタンパク質コードする遺伝子（以下、本発明の遺伝子という場合がある）は、特定の標的遺伝子に結合する転写因子のDNA結合ドメインをコードする遺伝子と融合させてキメラ遺伝子とし、特定の遺伝子のみを標的にした転写抑制を行うことができる。

すなわち、本発明のキメラ遺伝子は、転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するペプチド又はタンパク質と転写因子とが連結したキメラタンパク質を発現し、該キメラタンパク質における転写因子由来のDNA結合ドメインが結合する遺伝子の転写を特異的に抑制する。したがって、ある特定の遺伝子の転写抑制を行う場合、該遺伝子の転写を支配している転写因子を選び、該転写因子をコードする遺伝子の末端又はDNA結合ドメインに本発明の遺伝子を連結させてキメラ遺伝子を構築し、該遺伝子を適当なベクターに連結して、上記特定の遺伝子の転写を抑制したい生体部位に導入して、上記特定の遺伝子の転写を抑制すればよい。

さらに、本発明の上記キメラ遺伝子により生ずるキメラタンパク質は、その転

写因子のDNA結合ドメインが結合する遺伝子の転写を特異的に抑制し、この抑制は優性形質として現れる。すなわち、この遺伝子の転写に重複して関与する他の転写因子の機能をも抑制する。

この点については、CUP-SHAPEDCOTYLEDON1 (CUC1) 転写因子を用いた (Plant Cell, 9, 841, 1997) 場合を例にしてさらに詳細に説明する。

CUC1 は、同じ NAC ドメインを持つ CUC2 と共に、芽生えの頂芽の形成を制御する転写因子であり、CUC1 と CUC2 遺伝子の両方に変異を持つ場合にのみ、その植物体の子葉がカップ状の形態 (cup-shaped cotyledon) を示し、かつ頂芽の分裂組織の形成が行われないことが明らかになっている。一方、CUC1 又は CUC2 の一方だけに変異が入っているものは正常であることから、CUC1 と CUC2 は、機能的に重複した (redundant) 因子であることが知られている (Development, 126, 1563, 1999; Development, 128, 1127, 2000)。これら重複した機能を持つ CUC1 と CUC2 転写因子の遺伝子のうち、一方の遺伝子、例えば CUC1 遺伝子に、本発明のペプチドをコードする遺伝子を結合させたキメラ遺伝子を植物体で発現させた場合、発現したキメラタンパク質は、CUC1 転写因子ばかりでなく、機能的に重複した CUC2 転写因子の転写活性をも抑制し、CUC1 転写因子が制御する遺伝子の発現を抑制することができる。この場合、その植物体の子葉は cuc1/cuc2 の二重変異体の形質であるカップ状 (cup-shaped cotyledon) の形状になり、また、頂芽分裂組織は形成されない。後記実施例 5 では、本発明のペプチド D L D L E L R L G F A (該ペプチドを SRD と称する) をコードする遺伝子と CUC1 遺伝子とを融合させたキメラ遺伝子を構築し (図 14)、キメラ遺伝子でシロイヌナズナ植物を形質転換した結果、cuc1/cuc2 の二重欠損株である特徴を示すカップ状 (cup-shaped cotyledon) の形質 (図 15 : 右) を示すこと、及び CUC1 転写因子によって制御されている頂芽分裂細胞の形成を制御する STM 遺伝子の欠損株と同様に、頂芽分裂組織の形成がみられないことが確認された。このことは、転写活性化機能を有する CUC1 転写因子が、本発明の上記ペプチド D L D L E L R L G F A との融合により、転写抑制因子に機能変換したことを示し、さらに CUC1 転写因子ばかりでなく、機能的に重複する CUC2 転写因子の活性をも優先的に抑制し、下流の遺伝子の発現を抑制していることを示す。

以上のことから理解されるように、本発明のペプチド及びそれをコードする遺伝子は、任意の転写因子を転写抑制因子に変換できる能力を有し、さらに機能的に重複（リダンダント）する他の転写因子の活性も抑制する能力を有する。

一方、植物の転写因子は、多くの場合、CUC で示されたように、機能的に重複した複数の転写因子を持つ場合が多く、本発明により機能変換した転写抑制因子は、優性形質（ドミナント）で作用することから、本発明によれば、これまで一遺伝子のノックアウトでは明らかにされなかった転写因子の機能解析が可能となり、また、コムギなどの複二倍体ゲノムを持つ植物にも有効に作用できる等の点で、極めて有用な手段である。

上記したように、本発明のキメラ遺伝子は、該遺伝子に対応するキメラタンパク質を生成させ、このキメラタンパク質が標的遺伝子と結合することにより、該標的遺伝子の転写を抑制するものであるから、このキメラタンパク質を別途合成し、これを直接標的遺伝子が存在する生体部位に導入してもよい。

このキメラタンパク質の合成には、通常の遺伝子工学的手法を用いて行えばよく、例えば、上記キメラ遺伝子を適当なベクターに組み込み、これを用いて形質転換させた微生物を培養することにより、上記キメラタンパク質を多量に合成することができる。

本発明の遺伝子の転写因子に対する結合位置は、該転写因子中のDNA結合ドメインをコードする領域の下流側である。本発明の遺伝子を転写因子をコードする遺伝子に挿入しようとする場合、転写因子をコードする遺伝子の切断、本発明の遺伝子の連結、再結合等の面倒な操作を伴うので、単に該転写因子のタンパク質コード領域の下流側末端に、本発明の遺伝子を結合するのが簡便である。この点は本発明の利点の一つでもある。

なお、本発明の遺伝子は、上記式（I）から（III）で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、あるいは配列番号31又は61に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするものであれば塩基配列はどのようなものであってもよい。また、本発明の遺伝子は、転写因子をコードする遺伝子と連結するための連結部位を設けてもよく、また本発明の遺伝子のアミノ酸読み枠と転写因子をコードする遺伝子読み枠が一致しない場合には、一致するように遺伝子を設計する。

したがってそのための付加的な塩基配列を有していてもよい。

本発明において遺伝子の転写を抑制するには、上記キメラタンパク質を、直接生体に導入してもよいが、例えば植物の品種改良等を行う場合、恒常的に特定遺伝子の転写を抑制し、該遺伝子の発現を抑制する必要がある、上記キメラタンパク質をコードする遺伝子を適当なベクターに連結させ、この組換えベクターを用いて植物等を形質転換するのがより効果的である。これにより、キメラタンパク質をコードする遺伝子は植物体内で恒常的に発現し、生成されたキメラタンパク質は、遺伝子の転写を抑制し続ける。

さらに、この転写抑制について、転写因子としてシロイヌナズナ ETHLEN-INSENSITIVE3 遺伝子（以下、E I N 3 遺伝子という。）を用いた場合を例にとり、具体的に説明する。なお、このE I N 3 遺伝子及びその産生タンパクの配列を配列番号52に示す。

E I N 3 遺伝子産物であるE I N 3 タンパク質因子は、転写因子として機能し、植物ホルモンであるエチレンによって誘導される生理作用である黄化芽生えの形態変化（トリプルレスポンス）、伸長阻害、エチレン応答性遺伝子の発現などを媒体するエチレンシグナル伝達因子である。

このE I N 3 遺伝子のDNA結合ドメインをコードする領域に、本発明の上記ペプチド又はタンパク質をコードする遺伝子断片を連結してキメラ遺伝子とし、これを、例えば、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターを有する植物形質転換用ベクターに連結し、この組み換えベクターを用いてシロイヌナズナを形質転換する。シロイヌナズナ野生株が、エチレン又はその前駆体である1-アミノシクロプロパン-D-カルボン酸の存在下、黄化芽生えの形態変化（トリプルレスポンス）、伸長阻害を示すのに対して、上記形質転換されたシロイヌナズナは、これらのエチレン応答性の生理作用が著しく抑制される。従って、本発明の遺伝子は、F I N 3 の転写活性化機能を抑制機能に変換する。

本発明において、転写抑制因子に変換される転写因子及びその遺伝子は、上記E I N 3 とその遺伝子、酵母G A L 4、E R F 4、C B F 1、E R F 2、E R E B 1、C U C 1、C U C 2等のタンパク質又はその遺伝子等が挙げられるが、本発明は特にこれらに限定されるものではなく、広く動植物、微生物の転写因子及

びその遺伝子が利用可能である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施例を示すが、本発明は特にこれら実施例に限定されるものではない。

実施例 1 においては、(i) 酵母の GAL 4 転写因子の DNA 結合ドメインをコードしている領域を結合させた種々の合成遺伝子断片を、植物細胞で機能するカリフラワーモザイクウイルス 35 S プロモーターの下流につないでエフェクタープラスミドを構築するとともに、(ii) カリフラワーモザイクウイルス 35 S プロモーターのエンハンサー領域と GAL 4 タンパク質結合 DNA 配列とカリフラワーモザイクウイルスの 35 S プロモーターの TATA 領域をプロモーター領域に結合したルシフェラーゼ遺伝子からなるリポーター遺伝子を構築した。これらのエフェクタープラスミドとリポーター遺伝子とを同時にシロイヌナズナ葉にパーティクルガンを用いて導入し、リポーター遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子の活性を測定することによって合成した遺伝子断片の転写抑制能を調べたものである。

実施例 2 は、SUP の全アミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子、SUP の 175-204 アミノ酸配列を有する SUP 部分タンパク質をコードする遺伝子の転写抑制能をリポーター遺伝子であるルシフェラーゼ活性の測定により調べたものである。

実施例 3 は、SUP の 175-204 アミノ酸配列を有する SUP 部分タンパク質をコードする遺伝子による EIN3 の転写機能の抑制を植物体において調べたものである。

実施例 4 は、ERF3 の 191-225 のアミノ酸配列を有する ERF3 部分タンパク質をコードする遺伝子による EIN3 の転写機能の抑制を植物体において調べたものである。

実施例 5 は実際の植物における転写因子である CUC 1 遺伝子に DLDLELRIGFA (SRD; SUPERMAN リプレッションドメイン 194-204) をコードする遺伝子断片を結合させ、これをカリフラワーモザイクウイルス 35 S プロモーターの下流につないで形質転換プラスミドを構築し、該プラスミドによりシロイヌナズナ植物体を

形質転換させ、その発芽後の子葉の形態を観察することにより、CUC1 遺伝子及び該遺伝子と機能的に重複するCUC2 遺伝子に対する上記遺伝子断片の転写機能抑制効果を調べたものである。

実施例6はLDLELRGFA (SRD1;SUPERMAN リプレッションドメイン 195-204)、及びLDLNLAPMEF (RD1;ERF3 リプレッションドメイン 215-225) をコードする遺伝子を植物における転写因子であるEIN3 遺伝子に結合し、同様にしてシロイヌナズナ植物体を形質転換させ、エチレン存在下における植物の形態を観察することにより、EIN3 遺伝子に対する上記遺伝子断片の転写機能抑制効果を調べたものである。

実施例7は、PRODUCTION-OF-ANTHOCYANIN-PIGMENT1 (PAP1) [Borevitz J. O., Xia Y., Blount J., Dixon R. A. & Lamb C., Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. Plant Cell 12, 2383 (2000)]のカルボキシル末端にLDLELRGFAのアミノ酸配列で示される12アミノ酸からなるペプチド(SRDX)を付与したキメラリプレッサー(35S::PAP1SRDX)をシロイヌナズナ植物体に導入して、形質転換体植物を作製し、該植物におけるアントシアニン合成系遺伝子の転写抑制効果を調べたものである。

実施例8は、AtMYB23 転写因子[Kirik V., Schnittger A., Radchuk V., Adler K., Hulskamp M. & Baumlein H., Ectopic expression of the Arabidopsis AtMYB23 gene induces differentiation of trichome cells. Dev Biol. 235, 366 (2001); a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. Plant Cell 12, 2383 (2000)]のカルボキシル末端にLDLELRGFAのアミノ酸配列で示される12アミノ酸からなるペプチド(SRDX)を付与したキメラリプレッサー(35S::AtMYB23SRDX)をシロイヌナズナ植物体に導入することによって形質転換体植物を作製し、トリコームの発生を制御する遺伝子の転写抑制効果を調べたものである。

実施例9は、タバコ葉およびペチュニアにおいて転写抑制実験を行ったものである。

(実施例1) リプレッションドメインとして機能するペプチドの同定

(1) エフェクタープラスミド pGAL4DB-RD の構築 (図 1)

クローンテック社製(Clontech 社, USA)のプラスミド pBI221 を制限酵素 XhoI と SacI で切断し、T4 ポリメラーゼで平滑末端処理した後、アガロースゲル電気泳動で GUS 遺伝子を除き、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター (以下 CaMV 35S という) とノパリン合成酵素遺伝子の転写終止領域 (Nos ターミナーター、以下 Nos-ter という)を含む 35S-Nos プラスミド断片 DNA を得た。

クローンテック社製の pAS2-1 ベクターを制限酵素 HindIII で消化し、酵母 GAL4 タンパク質の DNA 結合領域 (1-147 アミノ酸残基) をコードする 748 bp の DNA 断片 (以下 GAL4DBD という) をアガロースゲル電気泳動によって単離した後、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理をした。この GAL4DBD コード領域を含む DNA 断片を、先ほどの 35S-Nos の DNA の 35S プロモーターと Nos ターミナーター間の平滑末端にした部位に挿入し、35S プロモーターに対して酵母 GAL4 タンパク質の DNA 結合領域の ORF が順方向に並んでいるものを選抜して p35S-GAL4DBD ベクターを構築した。

GAL4DBD のアミノ酸読み枠 (フレーム) と読み枠が一致するように設計した調査するペプチドをコードする両鎖 DNA を合成した。以下に合成した DNA の塩基配列と、それらがコードしているアミノ酸配列を示す。

ERF3RD (214/225)

Amino acid sequence: DLDLNLAPPMEF (配列番号 1)

5'-CGATCTTGATCTTAACCTTGCTCCACCTATGGAATTTTGAG-3' (配列番号 2)

5'-TCGACTCAAAATTCCATAGGTGGAGCAAGGTTAAGATCAAGATCG-3' (配列番号 3)

3 RD1

Amino acid sequence: LDLNLAPPMEF (配列番号 4)

5'-CCTTGATCTTAACCTTGCTCCACCTATGGAATTTTGAG-3' (配列番号 5)

5'-TCGACTCAAAATTCCATAGGTGGAGCAAGGTTAAGATCAAGG-3' (配列番号 6)

3 RD2

Amino acid sequence: LDLNLAAAAAA (配列番号 7)

5'-CCTTGATCTTAACCTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGAG-3' (配列番号 8)

5'-TCGACTCAAGCAGCAGCAGCAGCAGCAAGGTTAAGATCAAGG-3' (配列番号 9)

Min-LDLN

Amino acid sequence: LDLN (配列番号 10)

5'-CCTGGATCTAAATTAAG-3' (配列番号 11)

5'-TCGACTTAATTTAGATCCAGG-3' (配列番号 12)

Min-LDLNL

Amino acid sequence: LDLNL (配列番号 13)

5'-CCTGGATCTAAATCTGTAAG-3' (配列番号 14)

5'-TCGACTTACAGATTTAGATCCAGG-3' (配列番号 15)

SRD1

Amino acid sequence: LDLELRLGFA (配列番号 16)

5'-CCTGGATCTAGAACTCCGTTTGGGTTTCGCTTAAG-3' (配列番号 17)

5'-TCGACTTAAGCGAAACCCAAACGGAGTTCTAGATCCAGG-3' (配列番号 18)

SRD2

Amino acid sequence: LDLELGFA (配列番号 19)

5'-CCTGGATCTAGAACTCGGTTTCGCTTAAG-3' (配列番号 20)

5'-TCGACTTAAGCGAAACCGAGTTCTAGATCCAGG-3' (配列番号 21)

LELDL

Amino acid sequence: LELDLAAAAAA (配列番号 22)

5'-ACTGGAAGTAGATCTAGCTGCAGCTGCAGCTGCTTAAG-3' (配列番号 23)

5'-TCGACTTAAGCAGCTGCAGCTGCAGCTAGATCTAGTTCCAGT-3' (配列番号 24)



Amino acid sequence: LELRLAAAAA (配列番号 8 0)

5' -ACTAGAACTCCGTTTGGCTGCCGCAGCGGCTGCATAATGAG-3' (配列番号 8 1)

5' -TCGACTCATTATGCAGCCGCTGCGGCAGCCAAACGGAGTTCTAGT-3' (配列番号 8 2)

Amino acid sequence: DLELRL (配列番号 8 3)

5' -AGATCTAGAACTCCGTTTGTAAATGAG-3' (配列番号 8 4)

5' -TCGACTCATTACAAACGGAGTTCTAGATCT-3' (配列番号 8 5)

Amino acid sequence: LDLQLRLGY (配列番号 8 6)

5' -ACTGGATCTACAACTCCGTTTGGGTTATTACTAATGAG-3' (配列番号 8 7)

5' -TCGACTCATTAGTAATAACCCAAACGGAGTTGTAGATCCAG-3' (配列番号 8 8)

Amino acid sequence: LDLELRL (配列番号 8 9)

5' -ACTGGATCTAGAACTCCGTTTGTAAATGAG-3' (配列番号 9 0)

5' -TCGACTCATTACAAACGGAGTTCTAGATCCAG T-3' (配列番号 9 1)

Amino acid sequence: LDLELAAAAA (配列番号 9 2)

5' -ACTGGATCTAGAACTCGCTGCCGCAGCGGCTGCATAATGAG-3' (配列番号 9 3)

5' -TCGACTCATTATGCAGCCGCTGCGGCAGCGAGTTCTAGATCCAGT-3' (配列番号 9 4)

Amino acid sequence: LDLELRLAAA (配列番号 9 5)

5' -ACTGGATCTAGAACTCCGTTTGGCTGCCGCATAATGAG-3' (配列番号 9 6)

5' -TCGACTCATTATGCGGCAGCCAAACGGAGTTCTAGATCCAGT-3' (配列番号 9 7)

Amino acid sequence: LELDLAAAAA (配列番号 9 8)

5' -CCTTGAGCTTGATCTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTTGAG-3' (配列番号 9 9)

5' -TCGACTCAAGCAGCAGCAGCAGCAAGATCAAGCTCAAGG-3' (配列番号 1 0 0)

Amino acid sequence: LDLELRLG (配列番号 1 0 1)

5' -CCTGGATCTAGAACTCCGTGGTTAAG-3' (配列番号 1 0 2)

5' -TCGACTTAACCACGGAGTTCTAGATCCAGG -3' (配列番号 1 0 3)

Amino acid sequence: LELRL (配列番号 1 0 4)

5' -TCTA GAA CTC CGT TTG TAA TGAG-3' (配列番号 1 0 5)

5' -TCGACTCA TTA CAA ACG GAG TTC TAG A-3' (配列番号 1 0 6)

Amino acid sequence: FDLNFAPLDCV (配列番号 1 0 7)

5' -ATTGATCTTAATTTTGCACCGTTGGATTGTGTTTAAG-3' (配列番号 1 0 8)

5' -TCGACTCATTAAACACAATCCAACGGTGCAAAATTAAGATCGAAT-3' (配列番号 1 0 9)

Amino acid sequence: FDLNIFPPIPEF (配列番号 1 1 0)

5' -GTTTGACCTCAACATCCCTCCGATCCCTGAATTCTAAG-3' (配列番号 1 1 1)

5' -TCGACTTAGAATTCAGGGATCGGAGGGATGTTGAGGTCAAAC-3' (配列番号 1 1 2)

Amino acid sequence: FQFDLNFPLDCV (配列番号 1 1 3)

5' - CTTTCAATTCGATCTTAATTTTCCACCGTTGGATTGTGTTTAAG-3' (配列番号 1 1 4)

5' - TCGACTTAAACACAATCCAACGGTGGAATTAAGATCGAATTGAAAG-3' (配列番号 1 1 5)

Amino acid sequence: DLDLRL (配列番号 1 1 6)

5' -ACTGGATCTAGATCTCCGTTTGTAATGAG-3' (配列番号 1 1 7)

5' -TCGACTCATTACAAACGGAGATCTAGATCCAGT-3' (配列番号 1 1 8)

これらのペプチドをコードする DNA 断片を、制限酵素 SmaI と SalI で予め消化しておいた p35S-GAL4DBD プラスミドに組み込み、エフェクタープラスミド pGAL4DB-RD を構築した。

## (2) レポーター遺伝子の構築

### (2-1) pGAL4-LUC リポーター遺伝子の構築 (図 2)

プラスミド pUC18 を制限酵素 EcoRI と SstI で消化した。pBI221 プラスミド (クローンテック社) を制限酵素 EcoRI と SstI で消化し、Nos-ter (nopaline synthase terminator) 領域を含む 270bp の DNA 断片をアガロースゲル電気泳動によって単離した。得られた断片を制限酵素 EcoRI と SstI で消化しておいたプラスミド pUC18 の EcoRI-SstI 部位に挿入した。カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター-TATA ボックスを含む相補鎖の DNA 1 :

AGCTTAGATCTGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGACACGCTG

(配列番号 2 5) 及び DNA 2 :

GATCCAGCGTGTCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCTTATATAGAGGAAGGGTCTTGCAGATCTA

(配列番号 2 6)

を合成した。

合成した DNA を 90℃ 2 分加熱した後、60℃ で 1 時間加熱し、その後室温 (25℃) で 2 時間静置してアニーリングさせ 2 本鎖を形成させた。Nos-ter を持つ pUC18 プラスミドを制限酵素 HindIII と BamHI で消化した。合成した 2 本鎖 DNA を pUC18 の HindIII-BamHI 部位に挿入し、TATA-box と Nos-ter を含むプラスミドを構築した。

このプラスミドを制限酵素 SstI で消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理を行った。

ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子 (LUC) をもつプラスミドベクター PGV-CS2 (東洋インキ社製) を制限酵素 XbaI と NcoI で消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理を行った後、アガロースゲル電気泳動によって、ルシフェラーゼ遺伝子を含む 1.65 kb の DNA 断片を単離精製した。この DNA 断片を上記の TATA ボックスと Nos ターミネーターを含むプラスミドに挿入し、pTATA-LUC リポーター遺伝子を構築した。

酵母の GAL4 タンパク質の DNA 結合配列を 5 コピー持つプラスミド pG5CAT (Clontech 社製) を制限酵素 SmaI と XbaI で消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理を行った後、5 コピーの GAL4 タンパク質の DNA 結合配列を含む DNA 断片をアガロースゲル電気泳動で精製した。TATA-LUC ベクターを制限酵素 BglIII で消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理を行った。この部位に

平滑末端化した5コピーの GAL4 タンパク質のDNA結合配列含む DNA 断片を挿入し、得られたプラスミドのうち GAL4 タンパク質のDNA結合配列が順方向に向いているものを選抜し、リポーター遺伝子 pGAL4-LUC を構築した（図2参照）。

#### （2-2）p35S-GAL4-LUC の構築（図3）

プラスミド pBI121 を鋳型として、5末アッパープライマー：

CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC（配列番号27）と

3末ローワープライマー：

AAGGGTAAGCTTAAGGATAGTGGGATTGTGCGTCATC（配列番号28）を用いてPCRを行い、CaMV 35S プロモーター-800~-46領域を含むDNA断片を得た。制限酵素 HindIII で消化した後、CaMV 35S プロモーター-800~-46領域含む760bpのDNA断片をアガロースゲル電気泳動によって単離した。このHindIII断片を、あらかじめ制限酵素 HindIII で消化しておいたリポーター遺伝子 pGAL4-LUC に挿入し、CaMV 35S プロモーター-DNA が順方向に向いているものを選抜し、p35S-GAL4-LUC リポーター遺伝子を構築した（図3参照）。

#### （3）レファレンス遺伝子の構築

ウミシイタケ由来のルシフェラーゼ遺伝子をもつプロメガ社製カセットベクター pRL-null を制限酵素 NheI と XbaI 制限酵素で切断し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理を行った後、アガロースゲル電気泳動でウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子を含む948bpのDNA断片を精製した。このDNA断片をエフェクタープラスミドの構築の際に用いたGUS遺伝子を除いたpBI221ベクターのGUS遺伝子があった領域に挿入した。得られたプラスミドのうち、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子が順方向に向いているものを選抜した（pPTRLの構築）。

#### （4）レポーター遺伝子の活性測定法

シロイヌナズナ植物にリポーター遺伝子とエフェクタープラスミドをパーティクルガン法を用いて導入し、エフェクターの効果をリポーター遺伝子の活性を測定することによって調べた。

#### （5）パーティクルガンによる遺伝子導入

上記で作成した p35S-GAL4-LUC リポーター遺伝子とエフェクタープラスミド pGAL4DB-RD の DNA を各 1.2mg と、リファレンス遺伝子プラスミド 0.32mg を直径 1 mm の金粒 (BioRad 社製) 510mg にコーティングした。生育期間 21 日目のシロイヌナズナ葉 7 枚を、水で湿らせた濾紙をおいた 9 cm シャーレにならべ、BioRad 社製 PDS-1000/He ボンバートメント機を用いて DNA を打ち込んだ。22℃で 6 時間明所で静置した後、レポーター遺伝子の活性を測定した。

#### (6) ルシフェラーゼ活性測定

6 時間静置したシロイヌナズナ葉を、液体窒素中で粉碎し、Dual-Luciferase<sup>TM</sup> Reporter Assay System (Promega 社製) に添付されている Passive Lysis Buffer 200  $\mu$ l に懸濁した後、遠心して上清を回収した。この細胞抽出液 20  $\mu$ l を Dual-Luciferase<sup>TM</sup> Reporter Assay System (Promega 社製) に添付されている測定バッファー 100  $\mu$ l に混合し、ルミノメーター (TD20/20, Turner Design 社製) を用いてルシフェラーゼ活性測定を行った。ホタル・ルシフェラーゼ及びウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性の測定を測定キットの説明書に従って 10 秒間の発光を積分モードでカウントした。リファレンス遺伝子の活性値をリポーター遺伝子の活性値で割り、その相対値である Relative luciferase activity を測定値として求めた。実験は、エフェクタープラスミドの種類ごと 3 回個別にトランジェントアッセイ実験を行い、平均値と標準偏差を求めた。エフェクターを入れない場合の p35S-GAL4-LUC レポーター遺伝子の活性の相対値を 100 として、エフェクタープラスミドを同時に細胞に導入したときにリポーター遺伝子の活性値の変動によってエフェクターの効果を調査した。すなわち、p35S-GAL4-LUC レポーター遺伝子と各ペプチド配列をコードする DNA を組み込んだエフェクタープラスミド pGAL4DB-RD を導入したとき、リポーターの活性値が減少すれば、そのペプチドは、レポーター遺伝子の活性を抑制する効果 (リプレッサー機能) があることを示している。以下、リポーターの活性値を測定して、p35S-GAL4-LUC リポーターの相対活性値が 100 以下になる場合に、導入したエフェクターにはリプレッサー機能が存在すると判断した。

#### (7) リプレッサードメインの同定

図 4 A に、リポーター遺伝子とエフェクタープラスミドの構造を示す。図 4 B

及び下記表 1 にリポーター遺伝子の活性の測定結果を示す。

(表 1)

ペプチド名	ペプチド配列	相対値(%)
ERF3RD (214/225)	DLNLAPPMEF	15.0
3RD1	LDNLAPPMEF	14.6
3RD2	LDNLAAAAAA	17.5
SRD1	LDLELRGFA	2.0
SRD2	LDLELGFA	221
LELDL	LELDLAAAAAA	196
Min-LDLN	LDLN	153
Min-LDLNL	LDLNL	150
	LELRLLLLAAAA	130.6
	DLELR	8.9
	LDLQLRLGYY	3.8
	LDLELR	4.5
	LDLELAAAAAA	72.5
	LDLELRLLLL	6.9
	LELDLAAAAAA	196.0
	LDLELRG	8.9
	LELR	101.5
	FDLNFAPLDCV	17.5
	FDLNIFPPIPEF	16.0
	FQFDLNFPLDCV	10.9
	DLDLRL	9.2
コントロール	GAL4DB のみ	100

上記結果に示されるように、LDL (N/E) L又はFDLN (F/I) を含み、C-末端側に少なくとも6個のアミノ酸を持つペプチド、あるいはDL (E/Q/D) LRLを含むペプチドは、リポーター遺伝子の活性をエフェクターを導入し

ないリポーター遺伝子のみの場合（コントロール）に比べ 85%～98%減少させたことから、これらのペプチドは転写抑制能を持つ機能ペプチドとして機能することが証明された。

対照実験として行ったペプチド配列を含まない p35S-GAL4DBD は、リポーター遺伝子の活性を低下させなかった。このことは、GAL4DNA 結合ドメインに結合した上記ペプチドが、転写を抑制するリプレッサーとして機能していることを示している。

## （実施例 2） SUP 遺伝子含有エフェクタープラスミドによる転写抑制

### （1） SUP 遺伝子の単離

SUP 遺伝子の塩基配列は、すでに報告されている。シロイヌナズナ SUP 遺伝子のタンパク質コード領域の 5' 側と 3' 側に相当する配列をもつオリゴヌクレオチドをそれぞれ合成し、これらをプライマーとして、SUP 遺伝子を含む TAC ライブラリー K14B15 クローン（かずさ DNA 研究所より譲渡）を鋳型として、PCR を行い、SUP 遺伝子のタンパク質コード領域を含む DNA 断片を単離した。全塩基配列を決定し、すでに報告されている SUP 遺伝子のタンパク質コード領域であることを確認した。なお上記 PCR 反応の条件は、変性反応 94℃ 1 分、アニール反応 47℃ 2 分、伸長反応 74℃ 1 分を 1 サイクルとして 25 サイクル行った。

### （2） エフェクタープラスミドの構築

#### （2-1） SUP 遺伝子の全タンパク質コード領域を含むエフェクタープラスミド pGAL4DB-SUP の構築（図 5）

クローンテック社製 (Clontech 社, USA) のプラスミド pBI221 を制限酵素 XhoI と SacI で切断し、T4 ポリメラーゼで平滑末端処理した後、アガロースゲル電気泳動で GUS 遺伝子を除き、CaMV 35S と Nos-ter を含む 35S-Nos プラスミド断片 DNA を得た。

クローンテック社製の pAS2-1 ベクターを制限酵素 HindIII で消化し、酵母における転写活性化因子である GAL4DBD をアガロースゲル電気泳動によって単離した後、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理をした。この GAL4DBD コード領域を含む DNA 断片を、先ほどの 35S-Nos の DNA の 35S プロモーターと Nos ターミ

ネーター間の平滑末端にした部位に挿入し、35S プロモーターに対して酵母 GAL4 タンパク質の DNA 結合領域の ORF が順方向に並んでいるものを選抜して p35S-GAL4DBD ベクターを構築した。

GAL4DBD の読み枠（フレーム）が一致するように設計した SUP 遺伝子の 5 末アッププライマー primer 1（配列番号 29 : SUP 遺伝子塩基配列 1-18 に結合） : GATGGAGAGATCAAACAGC と、

制限酵素 SalI 部位を持つ 3 末ローワープライマー primer 2（配列番号 30 : SUP 遺伝子塩基配列 602-641 に結合） :

GATAAAGTTATTACCGTCGACTTAAGCGAAAC

を用いて SUP 遺伝子の全タンパク質コード領域（配列番号 31 : アミノ酸配列 1-204）を PCR 法によって増幅し、DNA 断片を得た。PCR 反応の条件は、変性反応 94℃ 1 分、アニール反応 47℃ 2 分、伸長反応 74℃ 1 分を 1 サイクルとして 25 サイクル行った。以下全ての PCR 反応は同じ条件で行った。得られた DNA 断片を制限酵素 SalI で消化した後、アガロース電気泳動によって目的とする DNA 断片を単離した。この SUP をコードする DNA 断片を、制限酵素 SmaI と SalI で予め消化しておいた p35S-GAL4DBD プラスミドに組み込み、エフェクタープラスミド pGAL4DB-SUP を構築した。

（2-2） SUP のアミノ酸配列 175-204 を含むエフェクタープラスミド pGAL4DB-175/204SUP の構築

GAL4DBD をコードするフレームと読み枠が一致するように設計した 5 末アッププライマー primer 3（配列番号 32 : 結合部位 SUP 塩基配列 522-539） : GAATGATGAAATCATCAG と、

制限酵素 SalI 部位を持つ 3 末ローワープライマー primer 2（配列番号 30 : 結合部位 SUP 塩基配列 602-641） :

GATAAAGTTATTACCGTCGACTTAAGCGAAAC

を用いて SUP のアミノ酸配列 175-204 コード領域に該当する塩基配列 523-612 の領域を含む DNA 断片を PCR 法によって得た。この DNA 断片を制限酵素 SalI で消化し、アガロース電気泳動によって目的とする DNA 断片を単離し、塩基配列を決定した。この SUP のアミノ酸配列 175-204 をコードする DNA 断片 (DNA 領域 523-



612) を、制限酵素 SmaI と SalI で予め消化しておいた 35S-GAL4DBD プラスミドに組み込み、エフェクタープラスミド pGAL4DB-175/204SUP を構築した。

### (2-3) 比較対照エフェクタープラスミドの構築 (図 6)

シロイヌナズナ AtERF5cDNA を含むクローン pAtERF5 を鋳型として、

5 末アッパープライマー primer 4 :

CATGGCGACTCCTAACGAAGTATCTGCAC (配列番号 33) と

3 末ローワープライマー primer 5 :

ATCGTTCAAAAACCTCAAGGCTAACTAATCAACAACGGTC (配列番号 34)

を用いて AtERF5 全タンパク質コード領域を PCR 法によって増幅した。この DNA 断片を、上記に示した平滑末端にした 35S-Nos プラスミド断片に組み込み、エフェクタープラスミド p35S-AtERF5 を構築した。

また、これとは別に、SUP 遺伝子及び 175/204SUP を用いない他は上記手段と同様にしてエフェクタープラスミド pGAL4DB を構築した。

### (3) レポーター遺伝子の構築

リポーター遺伝子として、以下の手法により、p35S-GAL4-LUC 及び pGAL4-GCC-LUC の 2 種を構築した。

#### (3-1) p35S-GAL4-LUC の構築 (図 2 及び図 3)

##### a. pGAL4-LUC の構築 (図 2)

プラスミド pUC18 を制限酵素 EcoRI と SstI で消化した。一方、pBI221 プラスミド (クローンテック社) を制限酵素 EcoRI と SstI で消化し、Nos-ter (nopaline synthase terminator) 領域を含む 270bp の DNA 断片をアガロースゲル電気泳動によって単離した。得られた断片を制限酵素 EcoRI と SstI で消化しておいたプラスミド pUC18 の EcoRI-SstI 部位に挿入した。次いで、カリフラワーマザイクウイルス 35S プロモーター-TATA ボックスを含む相補鎖の DNA 1 :

AGCTTAGATCTGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGACACGCTG (配列番号 35) と

DNA 2 :

GATCCAGCGTGTCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCTTATATAGAGGAAGGGTCTTGCAGATCTA (配列番号 36)

を合成した。合成した DNA を 90℃ 2 分加熱した後、60℃ で 1 時間加熱し、その後室温 (25℃) で 2 時間静置してアニーリングさせ 2 本鎖を形成させた。Nos を持つ pUC18 プラスミドを制限酵素 HindIII と BamHI で消化した。合成した 2 本鎖 DNA を pUC18 の HindIII-BamHI 部位に挿入し、TATA-box と Nos-ter を含むプラスミドを構築した。

このプラスミドを制限酵素 SstI で消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理した。

一方、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子(LUC)をもつプラスミドベクター PGV-CS2 (東洋インキ社製) を 制限酵素 XbaI と NcoI で消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理を行った後、アガロースゲル電気泳動によって、ルシフェラーゼ遺伝子を含む 1.65 kb の DNA 断片を単離精製した。この DNA 断片を上記の TATA ボックスと Nos ターミネーターを含むプラスミドに挿入し pTATA-LUC リポーター遺伝子を構築した。

さらに、酵母の GAL4 タンパク質の DNA 結合配列を 5 コピー持つプラスミド pG5CAT (Clontech 社製) を 制限酵素 SmaI と XbaI で消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理を行った後、5 コピーの GAL4 タンパク質の DNA 結合配列を含む DNA 断片をアガロースゲル電気泳動で精製した。TATA-LUC ベクターを制限酵素 BglIII で消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理を行った。この部位に平滑末端化した 5 コピーの GAL4 タンパク質の DNA 結合配列を含む DNA 断片を挿入し、得られたプラスミドのうち GAL4 タンパク質の DNA 結合配列が順方向に 向いているものを選抜し、リポーター遺伝子 pGAL4-LUC を構築した (図 2 参照)。

#### b. p35S-GAL4-LUC の構築 (図 3)

プラスミド pBI121 を鋳型として、

5 末アッパープライマー primer 6 :

CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC と (配列番号 37)

3 末ローワープライマー primer 7 :

AAGGGTAAGCTTAAGGATAGTGGGATTGTGCGTCATC (配列番号 38)

を用いて PCR を行い、CaMV 35S プロモーター-800~-46 領域を含む DNA 断片を得

た。制限酵素 HindIII で消化した後、CaMV 35S プロモーター-800~-46 領域含む 760bp の DNA 断片をアガロースゲル電気泳動によって単離した。この HindIII 断片を、あらかじめ制限酵素 HindIII で消化しておいたリポーター遺伝子 pGAL4-LUC に挿入し、CaMV 35S プロモーターDNA が順方向に向いているものを選抜し、p35S-GAL4-LUC リポーター遺伝子を構築した（図 3 参照）。

#### （3-2）pGAL4-GCC-LUC の構築（図 7 及び図 8）

4 個の GCC box 配列（AGCCGCC）を含む 45bpDNA の相補鎖（下記）を合成し、70°C で 15 分間加熱した後、室温で 60 分放置し、アニールさせ、2 本鎖 DNA とした。

5'-GATCAGCCGCCGATCAGCCGCCGATCAGCCGCCGATCAGCCGCC-3'（配列番号 39）

3'-TCGGCCGGCTAGTCGGCCGGCTAGTCGGCCGGCTAGTCGGCCGGGATC-5'（配列番号 40）

この 45bp の DNA 断片を、制限酵素 BglIII で予め消化しておいた上記の TATA-LUC ベクターと 1:1 のモル数になるように混合し、T4 リガーゼを用いてライゲーションを行い、GCC box を含む DNA 断片が順方向に入っているものを選択し、プラスミド pGCC-LUC を構築した。このプラスミドを制限酵素 BglIII で消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理を行った（図 7 参照）。

一方、酵母の GAL4 タンパク質の DNA 結合配列を 5 コピー持つプラスミド pG5CAT（Clontech 社製）を制限酵素 SmaI と XbaI で消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化処理を行った後、5 コピーの GAL4 タンパク質の DNA 結合配列含む DNA 断片をアガロースゲル電気泳動で精製した。この DNA 断片を、平滑末端処理をした、pGCC-LUC プラスミドに挿入し、GAL4 配列が順方向に入っているものを選択し、pGAL4-GCC-LUC リポーター遺伝子を構築した（図 8 参照）。

#### （4）パーティクルガンによる遺伝子導入

pGAL4-LUC レポーター遺伝子 1.6  $\mu$ g、エフェクタープラスミドとして pGAL4DB-SUP、又はそのデレーションである pGAL4DB-175/204SUP の DNA 1.2  $\mu$ g、比較対照プラスミド p35S-AtERF5 又は pGAL4DB1.2  $\mu$ g、及び リファレンス遺伝子プラスミド 0.32  $\mu$ g を直径 1mm の金粒（BioRad 社製）510  $\mu$ g にコーティングした。生育期間 21 日目のシロイヌナズナ葉 7 枚を、水でしめらせた濾紙をおいた 9cm シャーレにならべ、Bio-Rad 社製 PDS-1000/He ボンバートメント機をも

ちいて DNA を打ち込んだ。次いで、22℃で6時間明所で静置した後、レポーター遺伝子の活性を測定した。

#### (5) ルシフェラーゼ活性測定

6時間静置したシロイヌナズナ葉を、液体窒素中で粉碎し、Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega 社製) に添付されている Passive Lysis Buffer 200  $\mu$ l に懸濁した後、遠心して上清を回収した。この細胞抽出液 20  $\mu$ l を Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega 社製) に添付されている測定バッファー 100  $\mu$ l に混合し、ルミノメーター (TD20/20, Turner Design 社製) を用いてルシフェラーゼ活性測定を行った。ホタル・ルシフェラーゼ及びウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性の測定を測定キットの説明書に従って 10 秒間の発光を積分モードでカウントした。リファレンス遺伝子の活性値をリポーター遺伝子の活性値で割り、その相対値である Relative luciferase activity を測定値として求めた。実験は、エフェクタープラスミドの種類ごと 3 回個別にトランジェントアッセイ実験を行い、平均値と標準偏差を求めた。エフェクターを入れない場合の p35S-GAL4-LUC レポーター遺伝子の活性の相対値を 100、pGAL4-GCC-LUC レポーター遺伝子の相対値を 1 として、エフェクタープラスミドを同時に細胞に導入したときにリポーター遺伝子の活性値の変動によってエフェクターの効果を調査した。

図 9 A は、リポーター遺伝子とエフェクタープラスミドを示す図である。図 9 A において、5XGAL4 は GAL4 転写因子 DNA 結合配列、TATA は CaMV35S プロモーター-TATA ボックスを含む領域、LUC はルシフェラーゼ遺伝子、CaMV35S はカリフラワーモザイクウイルス 35S タンパク質遺伝子プロモーター、GAL4DB は酵母 GAL4 転写因子 DNA 結合ドメインコード領域、Nos はノパリン合成酵素遺伝子転写終止領域をそれぞれ表す。

図 9 B は SUP 及び SUP のディリーションがリポーター遺伝子の活性 (Relative Activity) に及ぼす影響を示す図である。図 9 B において、左の数字 (175/204 等) は、SUP のアミノ酸領域を示す。真ん中のボックスは左の数字に該当するアミノ酸配列領域を示す。右のグラフは、左の領域をもつエフェクタープラスミドを導入したときのリポーター遺伝子の活性を示す。

図 9 B の結果によれば、p35S-GAL4-LUC レポーター遺伝子と pGAL4DB-SUP エフェクタープラスミドを導入したときのレポーターの活性値が減少することから、pGAL4DB-SUP は、レポーター遺伝子の活性を抑制する効果（リプレッサー機能）があることを示している。pGAL4DB-SUP エフェクターは、レポーター遺伝子の活性をエフェクターを導入しないレポーター遺伝子の場合（コントロール）に比べ 75% 減少させた（図 9 B ; 1/204）。対照実験として行った SUP のコード領域を含まない p35S-GAL4DB は、レポーター遺伝子の活性を低下さなかった。このことは、SUP が転写を抑制するリプレッサーとして機能していることを示している。

また、SUP 遺伝子のタンパク質コード領域をディリーションした DNA 断片をもつエフェクタープラスミドである pGAL4DB-175/204SUP は、pGAL4DB-SUP を導入した場合よりもさらなる抑制効果を示し、レポーター遺伝子の活性を 95% 抑えるリプレッサー機能があることが示された。（図 9 B ; 175/204SUP）。

この結果から、SUP のリプレッサー機能を持つ領域（リプレッションドメイン）は、SUP のアミノ酸配列、175-204 領域に存在することが明らかとなった。このアミノ酸配列を配列番号 61 に示した。

図 10 A は、レポーター遺伝子（pGAL4-GCC-LUC）と各種エフェクタープラスミドを示す図である。

また、図 10 B によれば、pGAL4-GCC-LUC レポーター遺伝子と、転写活性化能を持つことが示されている p35S-AtTERF5 エフェクタープラスミドをシロイヌナズナ葉にパーティクルガンで導入すると、レポーター遺伝子の活性は、エフェクタープラスミドを導入しない場合（1 とする）に比べ、15 倍以上上昇した。レポーター遺伝子と p35S-AtERF5 さらに pGAL4DB-SUP を同時に導入した場合、レポーター遺伝子の活性は、2.5 倍程度にしか上昇しなかった。よって、このことは、SUP タンパク質は、AtERF5 の転写活性化能を 84% (1-2.5/15) 抑制する効果を持つことを示している。さらに、SUP のディリーション領域を持つ pGAL4DB-175/204SUP を GAL4-GCC-LUC レポーター遺伝子と pATERF5 エフェクターと同時に導入した場合、レポーター遺伝子の活性を 90% 抑制する効果を示した。p35S-AtERF5 によるレポーター遺伝子の活性の上昇は、pGAL4DB を導入した場合には、

影響されないことから、リポーター遺伝子の転写抑制効果は、SUP タンパク質の効果であることを示している。

(実施例 3) SUP リプレッションドメイン 175-204 をコードする遺伝子による、  
植物体における EIN3 の転写活性化機能の抑制

### (1) 形質転換用ベクターpBIG2の構築

クローンテック社製 (Clontech 社, USA) のプラスミド p35S-GFP を制限酵素 HindIII と BamHI で切断し、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター (CaMV 35S) を含む DNA 断片をアガロースゲル電気泳動で分離し回収した。

米国ミシガン州立大学より譲渡された植物形質転換用ベクター pBIG-HYG (Becker, D. 1990 Nucleic Acid Research, 18:203) を制限酵素 HindIII と Sst I で切断し、アガロースゲル電気泳動によって GUS 遺伝子を除いた DNA 断片を得た。

以下の配列を有する DNA を合成し、70℃で 10 分加温した後、自然冷却によりアニールさせて 2 本鎖 DNA とした。この DNA 断片には、5' 末端に BamHI 制限酵素部位、翻訳効率を高めるタバコモザイクウイルス由来の omega 配列、及び制限酵素部位 SmaI、SalI を有する。

5'-GATCCACAATTACCAACAACAACAAACAACAAACATTACAATTACAGATCCCGGGGTACCGTCGA  
CGAGCTC-3' (配列番号41)

5'-CGTCGACGGTACCCCCGGGATCTGTAATTGTAATGTTGTTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGGTAATTGT  
G-3' (配列番号42)

CaMV 35S プロモーター領域をふくむ DNA 断片と合成した 2 本鎖 DNA を GUS 遺伝子を除いた pBIG-HYG の HindIII、SstI 部位に挿入し、植物形質転換用ベクター pBIG2 を得た。

## (2) 形質転換ベクターpEIN3SUPRDの構築

米国ソーグ研究所から譲渡された、EIN3cDNA の全長を含む pEIN3 クローンを鑄型として、

5 末アッパープライマー primer 8 :

AATGATGTTTAATGAGATGGG (配列番号 43) と

3 末ローワープライマー primer 9 :

ATGAATCCCCGGGATATTATTC (配列番号 4 4) を用いて、EIN3 のアミノ酸配列 1-162 コード領域に該当する塩基配列 1-485 の領域を含む DNA 断片を PCR 法によって増幅し、制限酵素 SmaI で切断した後、アガロース電気泳動によって目的とする DNA 断片を単離した。この断片を制限酵素 SmaI で切断した pBIG2 に挿入し、順方向にクローニングされているものを単離し、pBIG2-EIN3-1/162 を得た。

EIN3cDNA の全長を含む pEIN3 クローンを制限酵素 SmaI と PstI で切断し、アガロース電気泳動によって EIN3 のアミノ酸配列 163-565 の領域をコードする DNA 断片 (487-1695) を単離した。この DNA 断片を、制限酵素 SmaI と PstI で切断しておいたクローニングベクター pBluescriptII に挿入しプラスミド pEIN3-163/565 を作成した。

EIN3cDNA の全長を含む pEIN3 クローンを鋳型として、

5 末アッパープライマー primer 10 :

CGACACTGCAGATCACAAC (配列番号 4 5) と

3 末端の終止コドン TAA を CCC に変換した、3 末ローワープライマー primer 11 :

ATCCCGAACCATATGGATACATCTTGCTGC (配列番号 4 6) を用いて EIN3 のアミノ酸配列 566-628 コード領域に該当する塩基配列 (1696-1884) の領域を含む DNA 断片を PCR 法によって増幅し、制限酵素 Pst I で切断した後、アガロース電気泳動によって単離した。

先に述べた実施例 2 (2) (2-2) と同様にアミノ酸の読み枠が一致するように作成しておいた、3' 末端に制限酵素 SalI 部位を有する SUP のアミノ酸配列 175-204 コード領域に該当する塩基配列 (523-612) の領域を含む DNA 断片と、EIN3 のアミノ酸配列 566-628 コード領域に該当する塩基配列 (1696-1884) の領域を含む DNA 断片を、制限酵素 PstI、SalI で切断しておいた上記 pEIN3-163/565 に挿入し、pEIN3-163/628-SupRD を作成した。

プラスミド pEIN3-163/628-SupRD を、制限酵素 SmaI と SalI で切断し、EIN3 のアミノ酸配列 163-628 領域と SUP の 175-204 の領域をコードする DNA 断片を、アガロース電気泳動によって単離した。単離した断片を、上記で述べた pBIG2-

EIN3-1/162 を制限酵素 SmaI で切断した pBIG2-EIN3-1/162 に挿入し、35S-EIN3-SupRD-Nos を含む形質転換ベクター pEIN3SUPRD を得た。

### (3) pEIN3SUPRD で形質転換した植物体の作成

pEIN3SUPRD によるシロイヌナズナ植物の形質転換は、Transformation of *Arabidopsis thaliana* by vacuum infiltration (<http://www.bch.msu.edu/pamgreen/protocol.htm>) に従った。ただし、感染させるのにバキュームは用いないで、浸すだけにした。プラスミド pEIN3RD を、土壌細菌

[ (*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 (C58C1Rifr) pMP90 (Gmr) (koncz and Schell 1986) ] 株にエレクトロポレーション法で導入した。導入した菌を 1 リットルの YEP 培地 (下記表 2) で OD600 が 1 になるまで培養した。

(表 2)

YEP medium (1 liter)	
10g	Bactopeptone
10g	yeast extraxt
5 g	NaCl

次いで、培養液から菌体を、回収し、1 リットルの感染用培地 (Infiltration medium) (下記表 3) に懸濁した。

(表 3)

Infiltration medium (1 liter)	
2.29g	MS salt
50g	Sucrose
0.5g	MES to pH 5.7 with KOH
0.044 $\mu$ M	benzylaminopurine
0.2ml	Silwet L-77

この溶液に、14 日間生育したシロイヌナズナを 1 分間浸し、感染させた後、再び生育させ結種させた。回収した種子を 50% ブリーチ、0.02% Triton X-100 溶液で 7 分間滅菌した後、滅菌水で 3 回リンスし、滅菌したハイグロマイシン選択培地 (下記表 4) に蒔種した。

(表 4)



### ハイグロマイシン選択培地

4.3 g/l	MS salt
1%	Sucrose
0.5g/l	MES to pH 5.7 with KOH
0.8%	Phytagar
30 g/ml	Hygromicine
500 ml	Vamcromicine

上記ハイグロマイシンプレートで生育する形質転換植物体を選抜し、土壤に植え換え、次世代の種子を得た。

#### (4) 形質転換植物のエチレン感受性の有無

得られた次世代 (T2) の形質転換植物の種子を、エチレンの前駆体である 1-aminocyclopropane-D-carboxylic acid (ACC) が最終濃度 10 $\mu$ M 添加され、滅菌された生育培地を含む MS プレート (下記表 5) に蒔種した。

(表 5)

### MS プレート選択培地

4.3 g/l	MS salt
1%	Sucrose
0.5g/l	MES to pH 5.7 with KOH
0.8%	Phytagar ACC (final 10 $\mu$ M)

上記種子を、4℃で3日間低温処理した後、暗所 22℃で3日間生育させ、定法に従って、エチレン応答を示す生理現象である黄化芽生えでのトリプルレスポンス (3重応答) を観察した。結果を図 1 1 及び図 1 2 に示す。

図 1 1 及び図 1 2 によれば、野生株である Col-0 は、ACC の存在下で、茎長フックが屈曲し、根の伸長が抑制されるトリプルレスポンスを示すが、pEIN3SUPRD で形質転換した植物体 (図 1 1 ; 35S::EIN3SUPRD) では、EIN3 の変異体である ein3 植物体 (図 1 1 ; ein3-1) と同様に、茎長の屈曲及び根の伸長阻害がみられず、エチレン非応答性の形質を示した。また、常光下で生育させた野生型植物体は、エチレンガス (100ppm 1ml/min) 常時存在下で、エチレン応答性の生理現象である矮性の植物体になるが、pEIN3SUPRD で形質転換した植物

体（図 1 2 ; 35S::EIN3SUPRD）では、EIN3 の変異体である ein3 植物体（図 1 2 ; ein3-1）よりもやや大きな植物体となった。

さらに、野生型ではエチレンで発現が誘導され、エチレン非応答性の変異体である ein3 植物体ではエチレンで発現が誘導されない遺伝子である PDF1.2 遺伝子、塩基性キチナーゼ（BCHN）遺伝子及び Ethylen Responsive Factor1（ERF1）遺伝子の発現について、野生型と pEIN3SUPRD で形質転換した植物体から RNA を精製し、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法を用いて調べた。

その結果、図 1 3 に示すように、エチレン処理（100ppM エチレンガス、12 時間）した野生型（図 1 3 : Col-0）では、PDF1.2、ERF1 及び BCHN 遺伝子の発現の誘導がみられた。一方、pEIN3SUPRD で形質転換した植物体（図 1 3 : 35S::EIN3SUPRD）は、エチレン処理を行っても、ein3 変異体植物同様 PDF1.2、ERF1 及び BCHN 遺伝子の発現の誘導がみられず、エチレン非応答性の形質を示した（図中、EF(elongation factor)は内性コントロールを示す）。

以上の結果から、SUP の 175-204 のアミノ酸配列を持つペプチド及びそれをコードする遺伝子は、任意の転写因子を転写抑制因子に変換できる能力を有していることが明らかとなった。

（実施例 4）ERF3 リプレッションドメイン 191-225 をコードする遺伝子による、植物体における EIN3 の転写活性化機能の抑制

（1）形質転換用ベクター pBIG2 の構築

形質転換用ベクター pBIG2 の構築は実施例 3（1）と同様にして行った。

（2）形質転換ベクター pEIN3RD の構築

米国ソーグ研究所から譲渡された、EIN3cDNA の全長を含む pEIN3 クローンを鋳型として、

5 末アッパープライマー primer 8 :

AATGATGTTTAATGAGATGGG（配列番号 4 3）と

3 末ローワープライマー primer 9 :

ATGAATCCCCGGGATATTATTC（配列番号 4 4）を用いて、EIN3 のアミノ酸配列 1-162 コード領域に該当する塩基配列 1-485 の領域を含む DNA 断片を PCR 法によ

って増幅し、制限酵素 SmaI で切断した後、アガロース電気泳動によって目的とする DNA 断片を単離した。この断片を制限酵素 SmaI で切断した pBIG2 に挿入し、順方向にクローニングされているものを単離し、pBIG2-EIN3-1/162 を得た。

EIN3cDNA の全長を含む pEIN3 クローンを制限酵素 SmaI と PstI で切断し、アガロース電気泳動によって EIN3 のアミノ酸配列 163-565 の領域をコードする DNA 断片 (487-1695) を単離した。この DNA 断片を、制限酵素 SmaI と PstI で切断しておいたクローニングベクター pBluescriptII に挿入しプラスミド pEIN3-163 /565 を作成した。

EIN3cDNA の全長を含む pEIN3 クローンを鋳型として、  
5 末アッパープライマー primer 10 ;

CGACACTGCAGATCACAAC (配列番号 45) と

3 末端の終止コドン TAA を CCC に変換した、3 末ローワープライマー primer 11 ;

ATCCCGAACCATATGGATACATCTTGCTGC (配列番号 46) を用いて EIN3 のアミノ酸配列 566-628 コード領域に該当する塩基配列 (1696-1884) の領域を含む DNA 断片を PCR 法によって増幅し、制限酵素 Pst I で切断した後、アガロース電気泳動によって単離した。

3' 末端に制限酵素 SalI 部位を有する ERF3 のアミノ酸配列 191-225 をコードする領域に相当する塩基配列 (571-675) の領域の DNA 断片を、EIN3 のカルボキシル基末端とフレームと読み枠が一致するように設計した。なお、ERF3 の全長遺伝子の塩基配列及びそのアミノ酸配列は配列番号 53 に示すとおりである。

5 末アッパープライマー primer 12 (配列番号 47 ; 結合部位 ERF3 塩基配列 569-593) :

AGTGGGTCCTACTGTGTCGGACTC と

制限酵素 SalI 部位を持つ 3 末ローワープライマー primer 13 (配列番号 48 ; 結合部位 ERF3 塩基配列 661-678) :

CCAAATAACATTATCGGTCGACTCAAAATTCCATAGGTG

を用いて ERF3 のアミノ酸配列 191-225 コード領域に該当する塩基配列 (571-675) の領域を含む DNA 断片を PCR 法によって得た。この DNA 断片を制限酵素

SalI で消化し、アガロース電気泳動によって目的とする DNA 断片を単離した。

この ERF3 のリプレッションドメインをコードする DNA 断片と、EIN3 のアミノ酸配列 566-628 をコードする塩基配列 (1696-1884) の DNA 断片を、制限酵素 Pst I - Sal I で切断しておいた上記 pEIN3-163/565 に挿入し、pEIN3-163/628-RD を作成した。

プラスミド pEIN3-163/628-RD を、制限酵素 Sma I と Sal I で切断し、EIN3 のアミノ酸配列 163-628 領域と ERF3 の 191-225 の領域をコードする DNA 断片を、アガロース電気泳動によって単離した。単離した断片を、上記で述べた pBIG2-EIN3-1/162 を制限酵素 smaI で切断した pBIG2-EIN3-1/162 に挿入し、35S-EIN3-RD-Nos を含む形質転換ベクター pEIN3RD を完成させた。

### (3) 比較対照形質転換ベクターの構築

上記と同じ方法で、下記配列の ERF3 の 191-225 のリプレッションドメインの 215 と 217 番目のアスパラギン酸を共にアラニンに置換した変異ドメインを持つ RDm をコードする DNA 断片を挿入し pEIN3RDm を完成させた。

VGPTVSDSSSAVEENQYDGKRDIALALNLAPPMEF (配列番号 49)

アラニン置換した変異ドメインをコードする DNA は、以下の 両ストランドを合成した。

5'-AGTGGGTCCTACTGTGTCGGACTCGTCCTCTGCAGTGAAGAGAACCAATATGATGGGGAAAAGAGGAA  
TTGATCTTGATCTTAACCTTGCTCCACCTATGGAATTTTGAG-3' (配列番号 50)

5'-TCGACTCAAAATTCCATAGGTGGAGCAAGGTTAAGATCAAGATCAATTCCTCTTTTCCCCATCATATT  
GGTTCTCTTCCACTGCAGAGGACGAGTCCGACACAGTAGGACCCACT-3' (配列番号 51)

### (4) pEIN3RD で形質転換した植物体の作成

実施例 3 (3) と同様にして、形質転換ベクター pEIN3PRD 及び比較対照形質転換ベクター pEIN3RDm を用いてシロイヌナズナ植物の形質転換を行い、さらにハイグロマイシンプレートで選抜し、次世代の種子を得た。

### (5) 形質転換植物のエチレン感受性の有無

得られた次世代 (T2) 形質転換植物の種子を、実施例 3 (4) と同様にして生育させ、エチレン応答を示す生理現象である、黄化芽生えでのトリプルレスポンス (3 重応答) を観察した。同一条件下で野生株 Col-0 及び EIN3 の変異体であ

る *ein3* 植物体のエチレン応答性も観察した。結果を図 1 1、図 1 2 に示す。

図 1 1 によれば、野生株である Col-0 は、ACC の存在下で、茎長フックが屈曲し、根の伸長が抑制されるトリプルレスポンスを示す。また、ERF3 の 191-225 のリプレッションドメインの 215 と 217 番目のアスパラギン酸を共にアラニンに置換した変異ドメインを持つ RDm を有する pEIN3-RDm で形質転換された植物体 (図 1 1 ; 35S::EIN3RDm) も、上記野生株 Col-0 と同様のエチレン応答性を示す。これに対して、pEIN3RD で形質転換された植物体 (図 1 1 ; 35S::EIN3RD) では、EIN3 の変異体である *ein3* 植物体 (図 1 1 ; *ein3*-1) と同様に、茎長の屈曲及び根の伸長阻害がみられず、エチレン非応答性の形質を示した。

また、図 1 2 によれば、常光下で生育させた野生型植物体は、エチレン (100ppm、12 時間) 常時存在下で、エチレン応答性の生理現象である矮性の植物体 (図 1 2 ; Col-1) になるが、pEIN3RD で形質転換した植物体 (図 1 2 ; 35S::EIN3RD) では、EIN3 の変異体である *ein* 植物体 (図 1 2 ; *ein3*-1) とほとんど変わらない大きさを示した。

さらに、野生型ではエチレンで発現が誘導されるが、エチレン非応答性の変異体である *ein3* 植物体ではエチレンで発現が誘導されない遺伝子である PDF1.2 遺伝子、塩基性キチナーゼ (BCHN) 遺伝子及び Ethylen Responsive Factor1 (ERF-1) 遺伝子の発現について、野生型と pEIN3RD で形質転換した植物体から RNA を精製し、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法を用いて調べた。

その結果、図 1 3 に示すように、エチレン処理 (100ppm エチレンガス、12 時間) した野生型では、PDF1.2、ERF-1 及び BCHN 遺伝子の発現の誘導がみられる。一方、pEIN3RD で形質転換した植物体では、エチレン処理を行っても、*ein3* 変異体植物同様 PDF1.2、ERF1 及び BCHN 遺伝子の発現の誘導がみられず、エチレン非応答性の形質を示した。

以上の結果から、ERF3 の 191-225 のアミノ酸配列を持つペプチド及びそれをコードする遺伝子は、任意の転写活性化因子を転写抑制因子に変換できる能力を持つことが明らかとなった。

(実施例 5) ペプチド DLDLELRLGFA (SRD; SUP リプレッションドメイン 194-204

に対応)をコードする遺伝子による、植物体における CUC1 の転写活性化機能の抑制

(1) 形質転換用ベクター pBIG2 の構築

形質転換用ベクター pBIG2 の構築は、実施例 3 (1) と同様に行った。

(2) 形質転換ベクター pCUC1SRD の構築

アミノ酸ペプチド DLDLELRLGFA (SRD という) と、転写因子 CUC-SHAPED COTYKEDON1 (CUC1) のタンパク質コード領域 (配列番号 54) のカルボキシル末端とが結合した状態のアミノ酸配列 (VSVWPFTLDLDLELRLGFA) になるように、かつ CUC1 遺伝子のコード領域から終止コドン を削除した配列と SRD のコード領域との読み枠が一致するように、相補鎖 (3' コンプリメント DNA) である以下の配列を合成した。

5'-TTAAGCGAAACCCAAACGGAGTTCTAGATCCAGATCGAGAGTAAAGGGCCACACTCAC-3' (配列番号 55)

一方、CUC1 遺伝子のタンパク質コード領域の 5' 領域に相当する以下の DNA 配列を合成した。

5'-GGGATGGATGTTGATGTGTTTAACGG-3' (配列番号 56)

これらの 2 個の一本鎖 DNA をプライマーとして、奈良先端大学田坂教授より譲渡された CUC1 cDNA の全長を含むクローンを鋳型にもちいて PCR を行い、CUC1 コード領域と SRD が融合した CUC1SRD 遺伝子を作成した。PCR の反応条件は、上記と同じである。

得られた DNA 試料からアガロース電気泳動によって目的とする DNA 断片を単離し、制限酵素 SmaI で切断した pBIG2 に挿入し、順方向にクローニングされているものを単離し、p35S::CUC1SRD を得た。

(3) p35S::CUC1SRD で形質転換した植物体の作成

実施例 3 (3) と同様にして、p35S::CUC1SRD によるシロイヌナズナ植物の形質転換を行った。

(4) 形質転換植物の発芽体の形質

得られた形質転換植物 (35S::CUC1SRD) の発芽体の形質を図 15 (右) に示す。

また、比較として、野生株 Col-0 及び cuc1/cuc2 の二重変異体における子葉の

形態を図 15（左）及び図 15（中）にそれぞれ示す。

野生株 Col-0 の子葉は、2 枚に別れており、基部、葉体部のいずれにおいても融合は見られなかった。一方、*cuc1/cuc2* の二重変異体では、2 枚の子葉が、その両片部のほとんどの領域で融合しており、カップ状の形質 (cup-shaped cotyledon) を示した。

p35S::CUC1SRD で形質転換したシロイヌナズナ植物体ではハイグロマイシン存在下で生育する全ての発芽体において、子葉の基部から葉状部にかけて、一部ないし大部分が融合した形状を示した。この形質は、*cuc1/cuc2* の二重欠損株で見られる形状と非常に似ている。また、子葉の一部が融合した形質は、*cuc1/stm-1* の二重欠損株で見られる形状とほぼ同様であった (Plant Cell, 9, 841, 1997; Development, 126, 1563, 1999; Development, 128, 1127, 2000)。さらに、これらの形質転換植物においては、ほとんどのもので、頂芽分裂組織の形成が見られなかった。

以上の結果から、DLDELRLGFA (SUP リプレッションドメイン 194-204 に対応) のアミノ酸配列を持つペプチド及びそれをコードする遺伝子は、任意の転写因子を転写抑制因子に変換できる能力を有していることが明らかとなった。

(実施例 6) ペプチド LDLELRGFA (SRD1; SUP リプレッションドメイン 195-204 に対応)、及びペプチド LDNLAPMEF (RD1; ERF3 リプレッションドメイン 215-225 に対応) をコードする遺伝子による、植物体における EIN3 の転写活性化機能の抑制

#### (1) 形質転換用ベクター pBIG2 の構築

形質転換用ベクター pBIG2 の構築は実施例 3 (1) と同様に行なった。

#### (2) 形質転換ベクター pEIN3SUPRD の構築

米国ソーグ研究所から譲渡された、EIN3cDNA の全長を含む pEIN3 クローンを鋳型として、

5 末アッパープライマー primer 8 ;

AATGATGTTTAATGAGATGGG (配列番号 43) と

3 末ローワープライマー primer 9 ;

ATGAATCCCCGGGATATTATTC (配列番号 44) を用いて、EIN3 のアミノ酸配列 1-162 コード領域に該当する塩基配列 1-485 の領域を含む DNA 断片を PCR 法によって増幅し、制限酵素 SmaI で切断した後、アガロース電気泳動によって目的とする DNA 断片を単離した。この断片を制限酵素 SmaI で切断した pBIG2 に挿入し、順方向にクローニングされているものを単離し、pBIGII-EIN3-1/162 を得た。EIN3cDNA の全長を含む pEIN3 クローンを制限酵素 SmaI と PstI で切断し、アガロース電気泳動によって EIN3 のアミノ酸配列 163-565 の領域をコードする DNA 断片 (487-1695) を単離した。この DNA 断片を、制限酵素 SmaI と PstI で切断しておいたクローニングベクター pBluescriptII に挿入しプラスミド pEIN3-163-565 を作成した。

EIN3cDNA の全長を含む pEIN3 クローンを鋳型として、

5 末アッパープライマー primer 10 :

CGACACTGCAGATCACAAC (配列番号 45) と

3 末端の終止コドン TAA を CCC に変換した、3 末ローワープライマー primer 11 :

ATCCCGAACCATATGGATACATCTTGCTGC (配列番号 46)

を用いて EIN3 のアミノ酸配列 566-628 コード領域に該当する塩基配列 (1696-1884) の領域を含む DNA 断片を PCR 法によって増幅し、制限酵素 Pst I で切断した後、アガロース電気泳動によって単離した。

前記実施例 2 (2) (2-2) と同様にアミノ酸の読み枠が一致するように作成しておいた、3' 末端に制限酵素 SalI 部位を有する SRD1 (LDLELRIGFA) のアミノ酸配列をコードするように設計した DNA の両鎖である配列 :

5'-CCTGGATCTAGAACTCCGTTTGGGTTTCGCTTAA-3' (配列番号 57)

5'-TCGACTTAAGCGAAACCCAAACGGAGTTCTAGATCCAGG-3' (配列番号 58)

又は、アミノ酸の読み枠が一致するように作成しておいた、3' 末端に制限酵素 SalI 部位を有する RD1 (LDLNLAPMEF) のアミノ酸配列をコードするように設計した DNA の両鎖である配列 :

5'-CCTTGATCTTAACCTTGCTCCACCTATGGAATTTTGA-3' (配列番号 59)

5'-TCGACTCAAATTCATAGGTGGAGCAAGGTTAAGATCAAGG-3' (配列番号 60)



を、実施例 2 で示した方法でアニーリングした DNA と、EIN3 のアミノ酸配列コード領域に該当する塩基配列 1696-1884 の領域を含む DNA 断片を、制限酵素 PstI、SalI で切断しておいた上記 pEIN3-163/565 に挿入し、pEIN3-163/628-SRD1 及び pEIN3-163/628-RD1 を作成した。

プラスミド pEIN3-163/628-SRD1 及び pEIN3-163/628-RD1 を、制限酵素 SmaI と SalI で切断し、SRD1 又は RD1 をコードする領域と EIN3 のアミノ酸配列 163-628 領域を融合させた DNA 断片を、アガロース電気泳動によって単離した。単離した断片を、実施例 3 (2) と同様にして得た pBIG2-EIN3-1/162 を制限酵素 SmaI で切断した pBIG2-EIN3-1/162 に挿入し、CaMV35S-EIN3-SupRD-Nos を含む形質転換ベクター pEIN3SRD1 及び pEIN3RD1 を得た。

#### (3) pEIN3SRD1 又は pEIN3RD1 で形質転換した植物体の作成

実施例 3 (3) と同様にして pEIN3SRD1 又は pEIN3RD1 によるシロイヌナズナ植物の形質転換を行い、次世代の種子を得た。

#### (4) 形質転換植物のエチレン感受性の有無

実施例 3 (4) と同様にして種黄化芽生えでのトリプルレスポンス (三重応答) を観察した。結果を図 16 及び図 17 に示す。

図 16 及び図 17 によれば、野生株である Col-0 は、ACC の存在下で、茎長フックが屈曲し、根の伸長が抑制されるトリプルレスポンスを示すが、pEIN3SRD1 又は pEIN3RD1 で形質転換した植物体 (図 16 ; 35S : EIN3SRD1, 35S : EIN3RD1) では、EIN3 の変異体である ein3 植物体 (図 16 ; ein3-1) と同様に、茎長の屈曲及び根の伸長阻害がみられず、エチレン非応答性の形質を示した。また、常光下で生育させた野生型植物体は、エチレンガス (100ppm) 常時存在下で、エチレン応答性の生理現象である矮性の植物体になるが、pEIN3SRD1 又は pEIN3RD1 で形質転換した植物体 (図 17 ; SRD1, RD1) では、EIN3 の変異体であるエチレン非感受性突然変異体 ein3 植物体 (図 17 ; ein3) をエチレン存在下で生育させた植物と同様な大きさを示した。

以上の結果から、LDLELRIGFA 及び LDNLAPPMEF のアミノ酸配列を持つペプチド及びそれをコードする遺伝子は、任意の転写因子を転写抑制因子に変換できる能力を有していることが明らかとなった。

(実施例 7) ペプチド : LDLDLELRLGFA (SRDX; SUP リプレッションドメイン 193-204 に対応) をコードする遺伝子による、植物体における PRODUCTION-OF-ANTHOCYANIN-PIGMENT1 (PAP1) 転写因子の機能変換

(1) 形質転換用ベクター p35S::PAP1SRDX の構築

(1-1) PAP1cDNA の単離

シロイヌナズナ cDNA ライブラリーより、以下のプライマーを用いて終止コドンを除く PAP1 のコード領域のみを含む DNA 断片を PCR を用いて増幅し、アガロース電気泳動により分離し回収した。なお、PCR の条件は実施例 3 と同様である。

5' プライマー :

5' -AAAATGGAGGGTTCGTCCAAAGGGCTGCGAAAAGG-3' (配列番号 6 2)

3' プライマー :

5' -ATCAAATTTACAGTCTCTCCATCGAAAAGACTC-3' (配列番号 6 3)

得られた PAP1 遺伝子の cDNA およびコードするアミノ酸配列を配列表の配列番号 6 6 に示す。

(1-2) ペプチド LDLDLELRLGFA (SRDX) をコードする遺伝子の合成

一方、12 アミノ酸ペプチド LDLDLELRLGFA (SRDX) をコードし、3' 末端に終止コドン TAA を持つように設計した、以下の配列を有する DNA をそれぞれ合成し、実施例 3 と同様にアニールして 2 本鎖 DNA とした。

5' -CTGGATCTGGATCTAGAACTCCGTTTGGGTTTCGCTTAAG-3' (配列番号 6 4)

5' -CTTAAGCGAAACCCAAACGGAGTTCTAGATCCAGATCCAG-3' (配列番号 6 5)

(1-3) 形質転換ベクターの作成

上記で得た PAP1 遺伝子タンパク質コード領域のみを含む DNA 断片と SRDX のコード領域を含む DNA 断片を、実施例 3 と同様にして、制限酵素 SmaI で切断した pBIG2 に挿入し、順方向にクローニングされているものを単離し、形質転換ベクター p35S::PAP1SRDX を得た。

(2) 形質転換ベクター p35S::PAP1SRDX により形質転換した植物体の作成

形質転換ベクター p35S::PAP1SRDX により形質転換して得たシロイヌナズナ植物の次世代種子と、比較のための野生株 (Col-0) の種子とを、3% のショ糖を

含む MS 寒天培地及びショ糖を含まない MS 寒天培地上に蒔種し、実施例 3 と同様の条件下で生育させた。その結果、野生型の発芽体では、ストレスを与える条件である 3 % のショ糖を含む MS 寒天培地において、アントシアニンの特徴を示す赤紫色の色素を蓄積した。これに対して、p35S::PAP1SRDX で形質転換したシロイヌナズナ植物の発芽体では、この色素の蓄積が見られなかった（図 18 A）。

また、アントシアニンの合成系であるフェニルプロパノイド合成に関わる遺伝子である dihydroflavonol reductase (DFR) 遺伝子の発現を後記参考例の RT-RCT 法を用いて調べた結果、野生型では、この遺伝子の発現が、ストレス処理と同時に上昇するのに対し、p35S::PAP1SRDX で形質転換したシロイヌナズナ植物体では、このような発現上昇は認められなかった（図 18 B）。これらのことは、SRDX ペプチドを付与された PAP1 転写因子が、リプレッサーに変換され、植物体内で DFR 遺伝子の発現を抑制することにより、アントシアニン合成を抑制していることを示している。また、このことは、このリプレッサーを用いた遺伝子発現抑制システムが、二次代謝物の合成抑制にも利用できることを示している。

（実施例 8） ペプチド：LDLDLELRGFA (SRDX) をコードする遺伝子による、植物体における AtMYB23 転写因子の機能変換

#### （1）形質転換ベクター p35S::AtMYB23SRDX の構築

##### （1-1）AtMYB23 cDNA の単離

シロイヌナズナ cDNA ライブラリーより、以下のプライマーを用いて終止コドンを除く AtMYB23 のコード領域のみを含む DNA 断片を PCR を用いて増幅し、アガロース電気泳動により分離し回収した。なお、PCR の条件は実施例 3 と同様である。

5' プライマー：

5' - AAAATGAGAATGACAAGAGATGGAAAAGAACATG-3' （配列番号 67）

3' プライマー：

5' -AAGGCAATACCCATTAGTAAAATCCATCATAGTG -3' （配列番号 68）

得られた AtMYB23 遺伝子の cDNA およびコードするアミノ酸配列を配列表の配列番号 69 に示す。

(1-2) ペプチド LDLDLELRLGFA (SRDX) をコードする遺伝子の合成

一方、12アミノ酸ペプチド LDLDLELRLGFA (SRDX) をコードし、3'末端に終止コドン TAA を持つように設計した、以下の配列を有する DNA をそれぞれ合成し、実施例3と同様にアニールして2本鎖DNAとした。

5' -CTGGATCTGGATCTAGAACTCCGTTTGGGTTTCGCTTAAG-3' (配列番号64)

5' -CTTAAGCGAAACCCAAACGGAGTTCTAGATCCAGATCCAG-3' (配列場号65)

(1-3) 形質転換ベクターの作成

上記で得た AtMYB23 遺伝子のタンパク質コード領域のみを含む DNA 断片と SRDX のコード領域を含む DNA 断片を、実施例3と同様にして、制限酵素 SmaI で切断した pBIG2 に挿入し、順方向にクローニングされているものを単離し、形質転換ベクター p35S::AtMYB23SRDX を得た。

(2) 形質転換ベクター p35S::AtMYB23SRDX により形質転換した植物体の作成

形質転換ベクター p35S::AtMYB23SRDX により形質転換されたシロイヌナズ植物の次世代種子と、比較のための野生株 (Col-0) の種子とを、MS 寒天培地上に蒔種し、実施例3と同様の条件下で生育させた。その結果、p35S::AtMYB23SRDX で形質転換した植物体は、野生型植物である Col-0 では表皮に存在するトリコームが無いか、若しくは著しくその数が野生型に比べて著しく減少している植物体となった (図19A)。

また、トリコームの発生に関わる遺伝子である GLABRA1 (GL1), GLABRA2 (GL2), TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1) の発現を後記参考例の RT-PCR を用いて調べた。野生型ではこれら3種の遺伝子は同様に発現しているのに対し、p35S::AtMYB23SRDX で形質転換したトリコームを持たない植物体においては、GL2 の発現が著しく抑制されていることが明らかになった (図19B)。これらのことは、SRDX ペプチドを付与された AtMYB23 転写因子が、リプレッサーに変換され、植物体内で、GL2 遺伝子の転写を抑制することにより、トリコームの発生を抑制していることを示している。

(実施例9) タバコ葉およびペチュニアにおける転写抑制実験

リポーター遺伝子として CaMV35S-GAL4::LUC、エフェクタープラスミドとして CaMV35S::GAL4DBD:RD (SUPリプレッションドメイン 175-204 領域) を用い、実施例 2 と同様にしてタバコ (*Nicotiana tabacum* BY4) 種子蒔種後 2 週間目の植物体から採取した葉 (1.5cm) にパーティクルガン法を用いて導入した後、水で湿らせた濾紙上で 25℃、16 時間静置後、リポーター遺伝子であるルシフェラーゼの活性を測定した。その結果、コントロールとして用いた 35S-GAL4DB とリポータープラスミドを導入したもの (相対値 100 とする) に比べ、35S-GAL4DB-RD を導入した場合、リポーター遺伝子の活性を 84% 抑制する効果を示した。また、同様にして、ペチュニア種子蒔種後 3 週間目の植物体から採取した葉 (1.0cm) に上記のエフェクタープラスミドとリポータープラスミドをパーティクルガンを用いて導入し、ルシフェラーゼの活性を測定した。その結果、コントロールとして用いた 35S-GAL4DB とリポータープラスミドを導入したもの (相対値 100 とする) に比べ、35S-GAL4DB-RD を導入した場合、リポーター遺伝子の活性を 82% の抑制する効果を示した。

これらの結果より、リプレッションドメインを持つキメラ遺伝子は、シロイヌナズナばかりでなく、タバコ葉およびペチュニアにおいても転写抑制機能を持つことがわかった。

#### (参考例) RT-PCR 方法による遺伝子発現の解析法

上記実施例 7、8 における RT-PCR 方法による遺伝子発現の解析法を以下に示す。

既に述べた方法でシロイヌナズナ植物葉から、全 RNA を抽出精製した。このうち 1.65ug または 2.5ug の全 RNA を分取し、混在する DNA を除くため下記の条件で DNase 処理を行った。

全 RNA	1.65ug または 2.5ug
10x DNase Buffer	5ul
DNase I	1ul (5 u)
Rnase Inhibitor	0.5ul (10 u)
DEPC 処理水	全量 50ul に調整

37℃で 30 分間反応したのち、フェノール・クロロホルム溶液を加えて各酵素を失活させエタノール沈殿にて DNA を除いた乾燥全 RNA を調製した。

次に全 RNA よりアマシャム社製 T-Primed First-Strand Kit を用いて cDNA の first strand の合成を行った。乾燥させた 1.65ug または 2.5ug の全 RNA を 33ul の DEPC 処理水に懸濁させ、65℃で 5 分間インキュベーションした後、First-Strand Reaction Mix の入ったチューブに RNA 溶液を加え、37℃で 60 分間反応させた。この反応により理論的に全 RNA が first strand cDNA に転換されたと考えられる。

合成した first strand cDNA を鋳型として、調べたい遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR を行った。使用したプライマーの塩基配列及び P C R 反応溶液の組成を以下に示す。

(PCR に用いたプライマーの塩基配列)

$\beta$ -チューブリン (TUB)

5' プライマー : 5' - CGTGGATCACAGCAATACAGAGCC (配列番号 7 0)

3' プライマー : 5' - CCTCCTGCACTTCCACTTCGTCTTC (配列番号 7 1)

DFR

5' プライマー : 5' - AAAAAGATGACAGGATGGGT (配列番号 7 2)

3' プライマー : 5' - CCCCTGTTTCTGTCTTGTTA (配列番号 7 3)

TTG1

5' プライマー : 5' - GGGATGGATAATTCAGCTCCAGATTC (配列番号 7 4)

3' プライマー : 5' - AACTCTAAGGAGCTGCATTTTG (配列番号 7 5)

GL1

5' プライマー : 5' - GGGATGAGAATAAGGAGAAGAGATGAAAAAGAG (配列番号 7 6)

3' プライマー : 5' - AAGGCAGTACTCAATATCACTAGAAGCAAAATT (配列番号 7 7)

GL2

5' プライマー : 5'- ATGGCCGTCGACATGTCTTCCAAACAACCCACC (配列番号 7 8)

3' プライマー : 5'- GCAGGGAGTTCTCGTGCCGTTCTTGAATAG (配列番号 7 9)

(PCR 反応溶液の組成)

鋳型 cDNA	1ul (換算すると全 RNA として 50ng または 75ng)
10×PCR Buffer	5ul
2.5mM dNTP mix	4ul
5' プライマー	0.5ul (100pmol/ul)
3' プライマー	0.5ul (100pmol/ul)
rTaq ポリメラーゼ	0.25ul (1.25u)
DEPC 処理水	38.75ul

PCR の条件は、95℃で 2 分間反応させ変性させた後、95℃30 秒、58℃30 秒、72℃1 分を一サイクルとし、調べる遺伝子により 25 から 35 サイクルに変化させ行った。

次に、上記の一連の操作により得られた RT-PCR 産物をサザン法により半定量学的に評価した。PCR 反応で増幅した DNA の 1/100～1/1000 量をアガロースゲル電気泳動し、ナイロンメンブレンにトランスファーした。相当する遺伝子 DNA をプローブとして調製し、アマシャム製 ECL direct nucleic acid labeling and detection system キットを用いて標識し、ハイブリダイゼーション及び検出を行った。検出されたバンドは調べたい遺伝子の mRNA に相当する DNA 量を意味することから、これをワイルドタイプと形質転換サンプルと比較することにより、個々の遺伝子の発現量の考察を行った。この際、比較対照として内在性遺伝子  $\beta$ -チューブリン (TUB) の発現量を同時に検出した。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書に組み入れるものとする。

産業上の利用可能性

本発明の転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するペプチドは、極めて短いサイズであるため、その合成は極めて簡単であり、しかも、効果的に遺伝子の転写を抑制できる。

本発明の遺伝子は、特定の標的遺伝子に結合する転写因子のDNA結合ドメインをコードする遺伝子と融合させることにより、特定の遺伝子のみを標的にした転写抑制を行うことができる。また、この抑制は優性形質として現れ、この転写因子の転写に重複して関与する他の転写因子の機能をも抑制する。したがって、一遺伝子のノックアウト法では明らかにされなかった転写機能解析に非常に有効であり、また、小麦等のように複2倍体ゲノムを持つ植物にも適用できる。

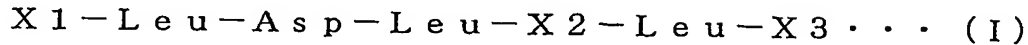
本発明の遺伝子はまた、例えばガン遺伝子の転写調節領域に特異的に結合するDNAと融合させて、細胞内で発現させることにより、ガン遺伝子の発現を効率的に抑制することが可能となる。

さらに、本発明の遺伝子は、例えば、植物においては、色素代謝系の酵素をコードする遺伝子の発現を制御することによってこれまでには得られなかった色違いの花弁を有する花を創作することを可能にし、また、アレルギーとなるタンパク質の発現を抑制することによってアレルギーの少ない食物の生産を可能にする。また、さらに、リグニン合成の遺伝子の発現を抑制することによって、リグニン含量の少ない木を作り、これにより高品質のパルプを生産するも可能である。従って、本発明は極めて広範な分野において適用可能でかつ有用な技術手段を提供する。



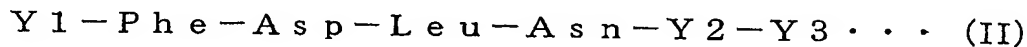
## 請 求 の 範 囲

1. 下記式 (I) で表されるアミノ酸配列を有し、かつ転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するペプチド。



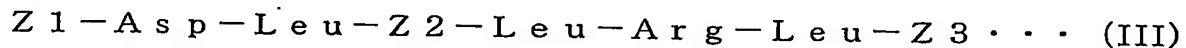
(式中、X1は0～10個のアミノ酸残基を表し、X2はAsn又はGluを表し、X3は少なくとも6個のアミノ酸残基を表す。)

2. 下記式 (II) で表されるアミノ酸配列を有し、かつ転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するペプチド。



(式中、Y1は0～10個のアミノ酸残基を表し、Y2はPhe又はIleを表し、Y3は少なくとも6個のアミノ酸残基を表す。)

3. 下記式 (III) で表されるアミノ酸配列を有し、かつ転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するペプチド。



(式中、Z1はLeu又はAsp-Leu又はLeu-Asp-Leuを表し、Z2はGlu又はGln又はAspを表し、Z3は0から10個のアミノ酸残基を表す。)

4. Asp-Leu-Z4-Leu-Arg-Leuで表されるアミノ酸配列を有し、かつ転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するペプチド。

(式中、Z4はGlu又はGln又はAspを表す。)

5. 以下の(a)から(d)のいずれかのアミノ酸配列を有し、かつ転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するタンパク質

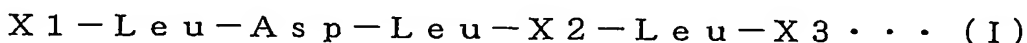
(a) 配列番号31に示すアミノ酸配列

(b) 配列番号31に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列

(c) 配列番号61に示すアミノ酸配列

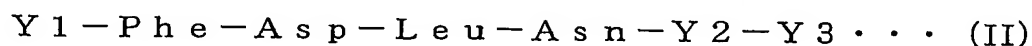
(d) 配列番号61に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列

6. 下記式 (I) で表されるアミノ酸配列を有し、かつ転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するペプチドをコードする遺伝子。



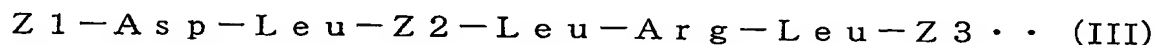
(式中、X1は0～10個のアミノ酸残基を表し、X2はAsn又はGluを表し、X3は少なくとも6個のアミノ酸残基を表す。)

7. 下記式 (II) で表されるアミノ酸配列を有し、かつ転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するペプチドをコードする遺伝子。



(式中、Y1は0～10個のアミノ酸残基を表し、Y2はPhe又はIleを表し、Y3は少なくとも6個のアミノ酸残基を表す。)

8. 下記式 (III) で表されるアミノ酸配列を有し、かつ転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するペプチドをコードする遺伝子。



(式中、Z1はLeu又はAsp-Leu又はLeu-Asp-Leuを表し、Z2はGlu又はGln又はAspを表し、Z3は0から10個のアミノ酸残基を表す。)

9. Asp-Leu-Z4-Leu-Arg-Leuで表されるアミノ酸配列を有し、かつ転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するペプチドをコードする遺伝子。

(式中、Z4はGlu又はGln又はAspを表す。)

10. 以下の(a)から(d)のいずれかのアミノ酸配列を有し、かつ転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有するタンパク質をコードする遺伝子。

(a) 配列番号31に示すアミノ酸配列

(b) 配列番号31に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列

(c) 配列番号61に示すアミノ酸配列

(d) 配列番号61に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列

11. 請求項1から5のいずれかに記載のペプチド又はタンパク質をコードする

部分を含み、その両端部に制限酵素部位を有する二本鎖 DNA。

12. 請求項1から5のいずれかに記載のペプチド又はタンパク質と転写因子とを連結したキメラタンパク質。

13. 請求項6から10のいずれかに記載の遺伝子と転写因子をコードする遺伝子とを連結したキメラ遺伝子。

14. 請求項13に記載のキメラ遺伝子を有する組み換えベクター。

15. 請求項14に記載の組み換えベクターを含む形質転換体。

16. 請求項14に記載の組み換えベクターを含む植物。

図 1

## エフェクタープラスミドの構築

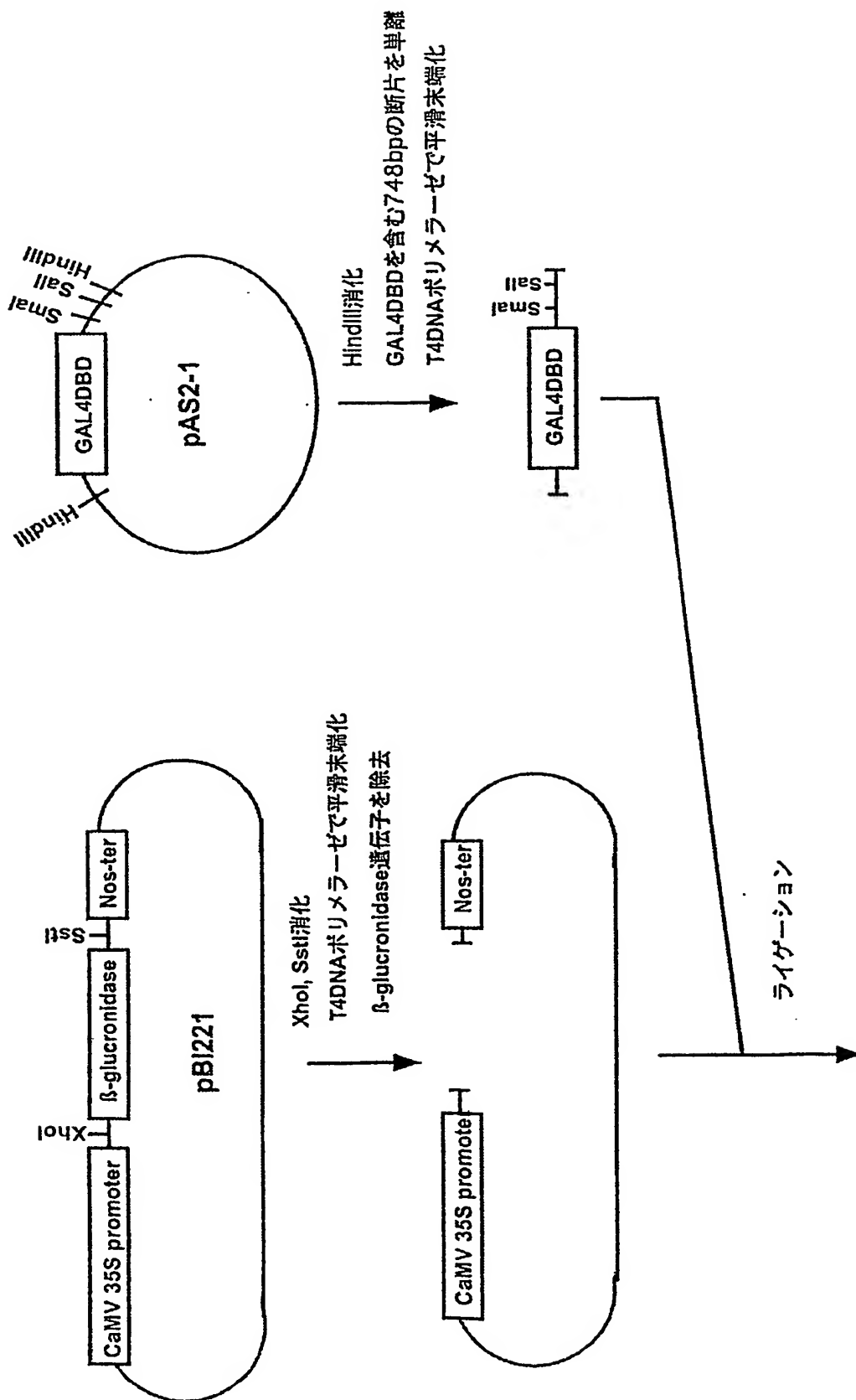
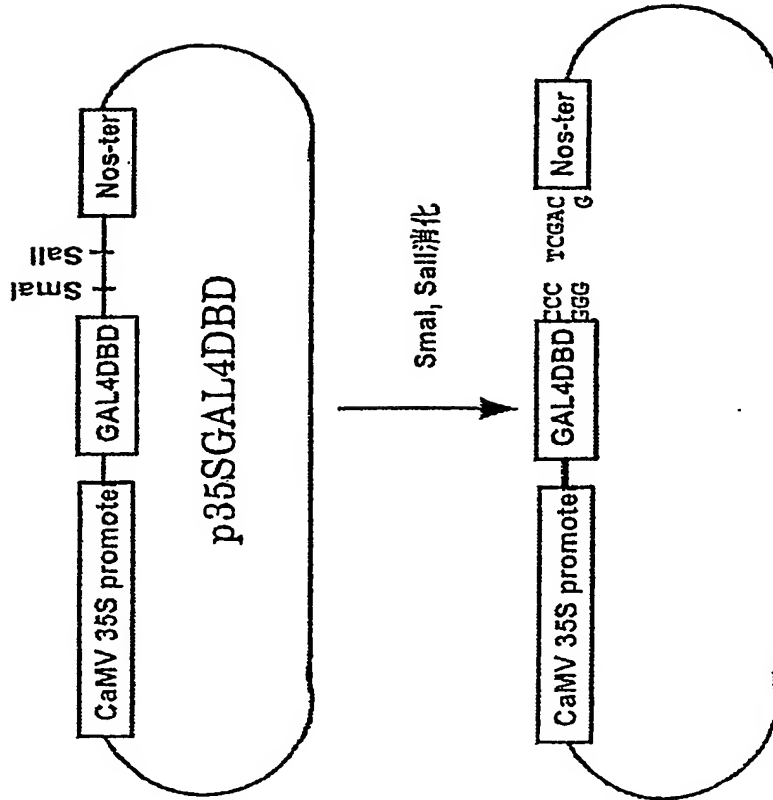


図1



3'側にSall部位を持つ  
合成2本鎖DNA

ERF3RD(214/225) 配列番号2, 3  
3RD1 配列番号5, 6  
2RD2 配列番号8, 9  
Min-LDLN 配列番号11, 12  
Min-LDLNL 配列番号14, 15  
SRD1 配列番号17, 18  
SRD2 配列番号21, 22  
LELDL 配列番号23, 24

図 1

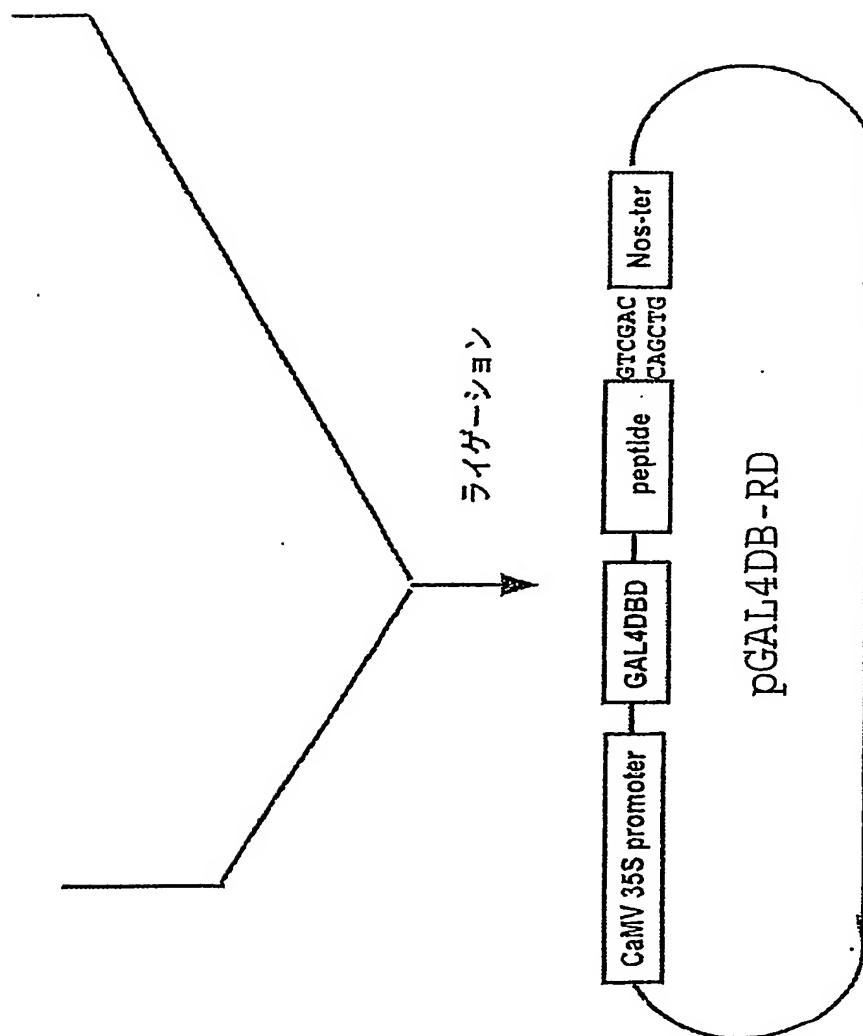


図 2

レポーター遺伝子の構築

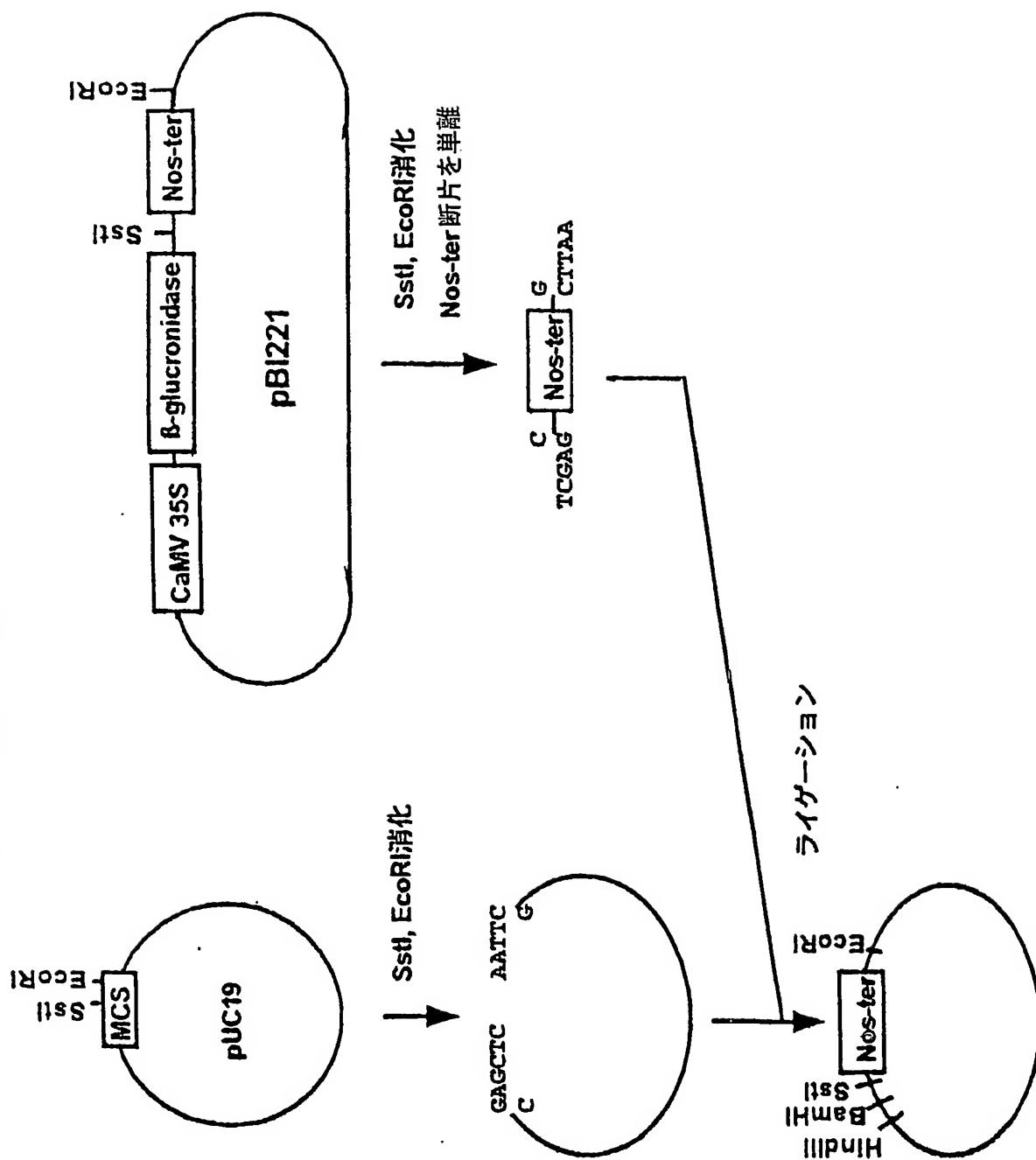


図2

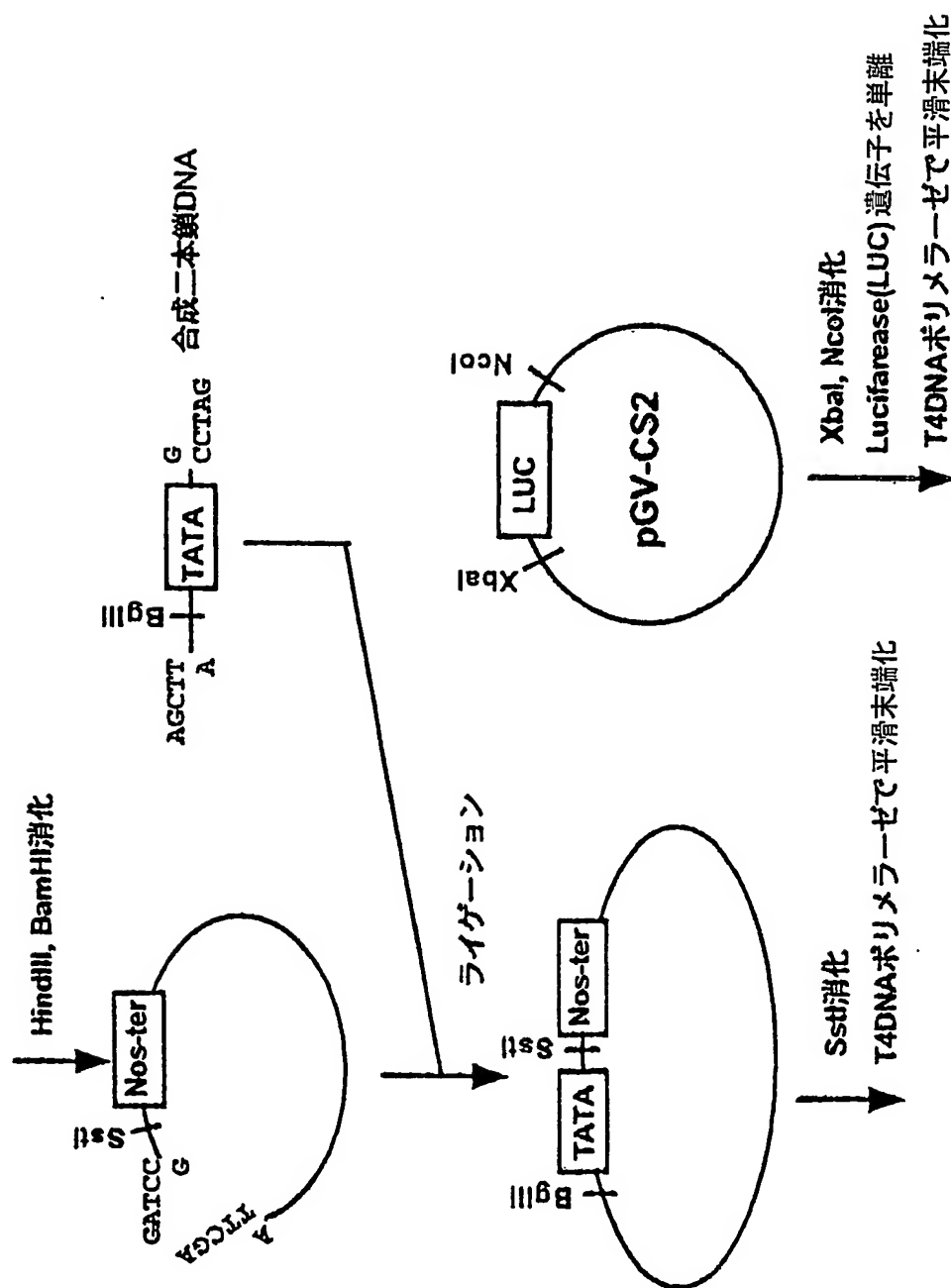
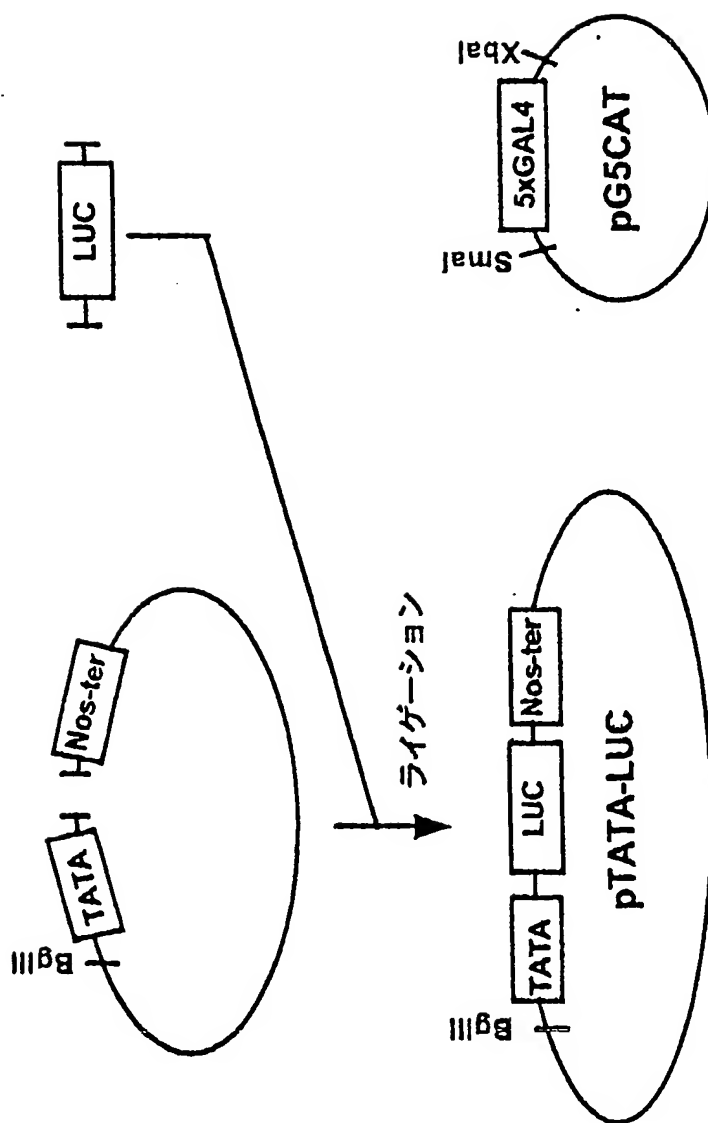




図2



2/2/19

差替え用紙(規則26)

図2

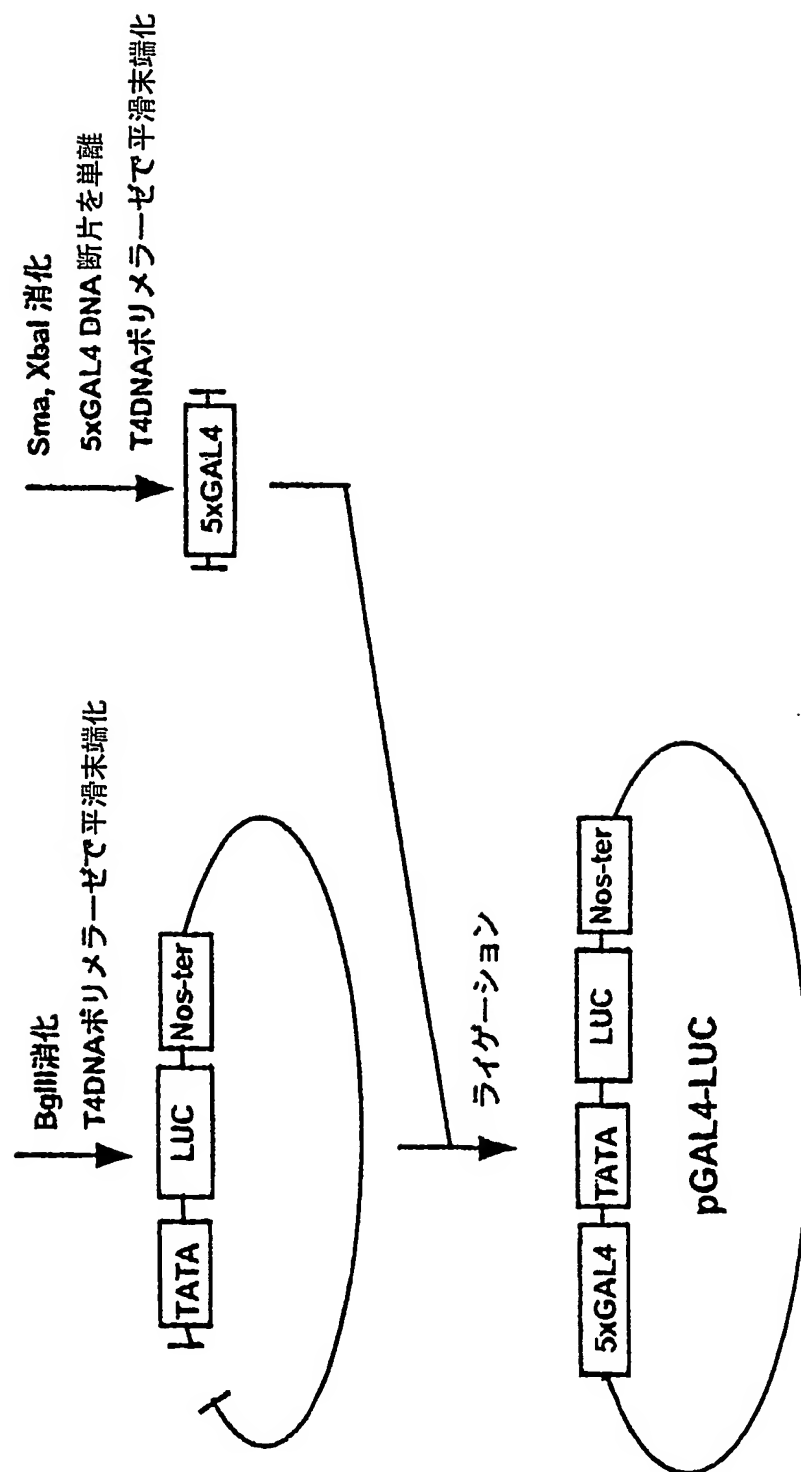


図3

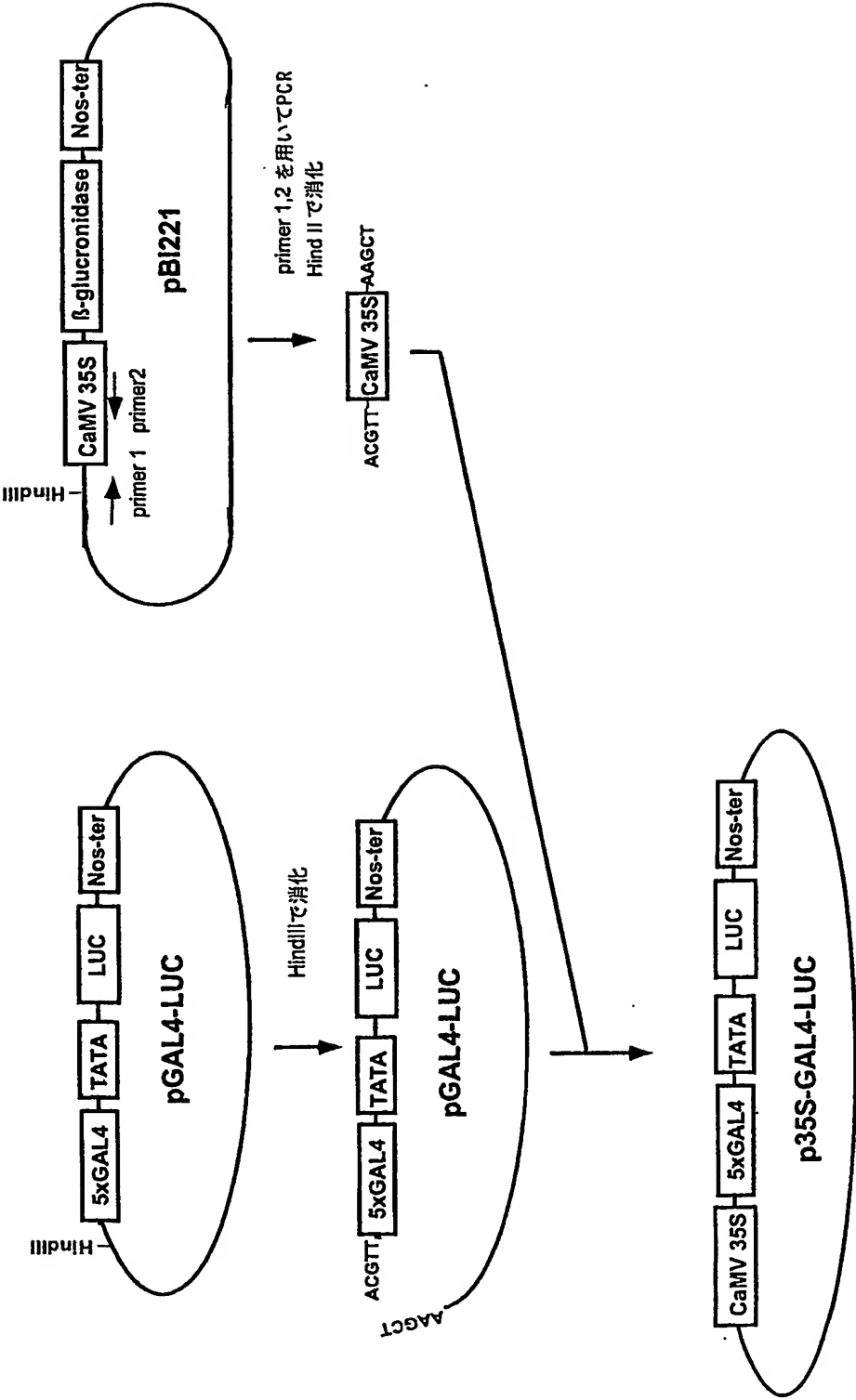
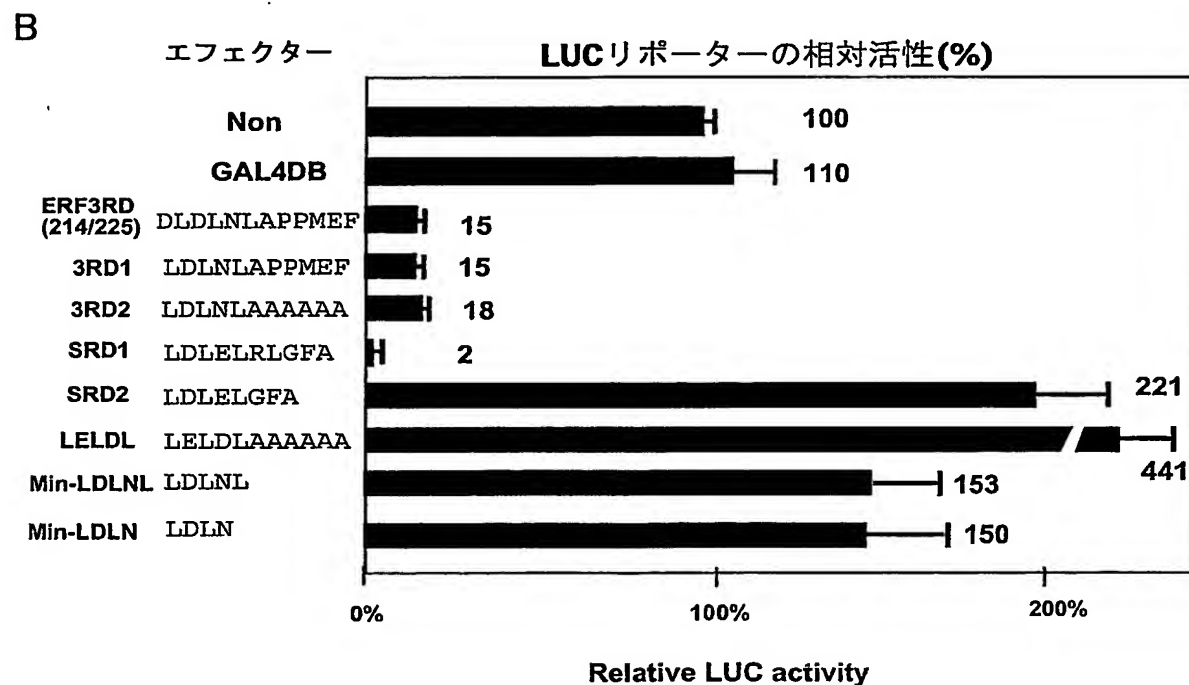
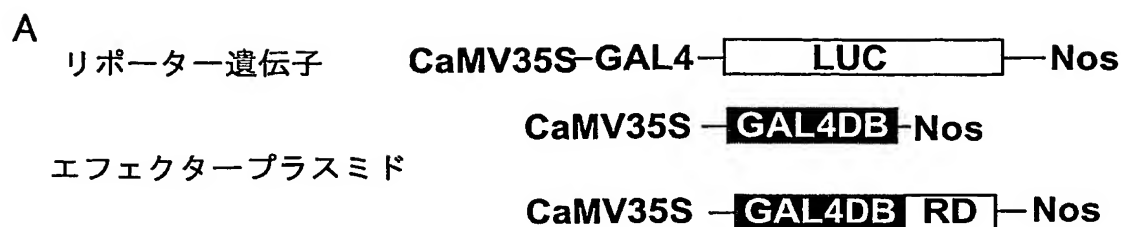


図4



転写抑制機能ペプチド

DLDLNLAPPMEF  
LDLNLAPPMEF  
LDLNLAAAAAA  
LDLELRGFA

共通配列      LDLN/ELXXXXX

図5

エフェクタープラスミドの構築

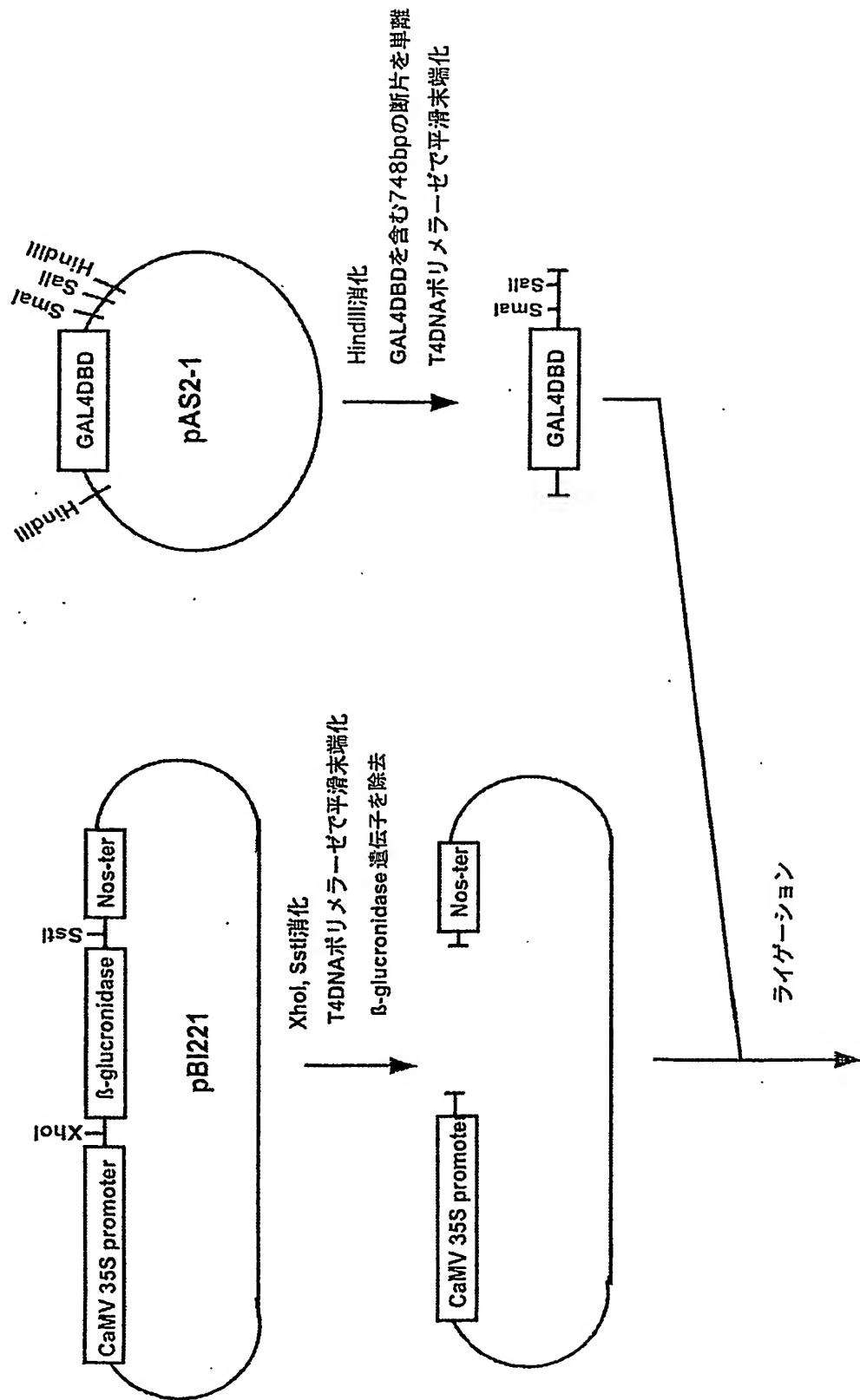
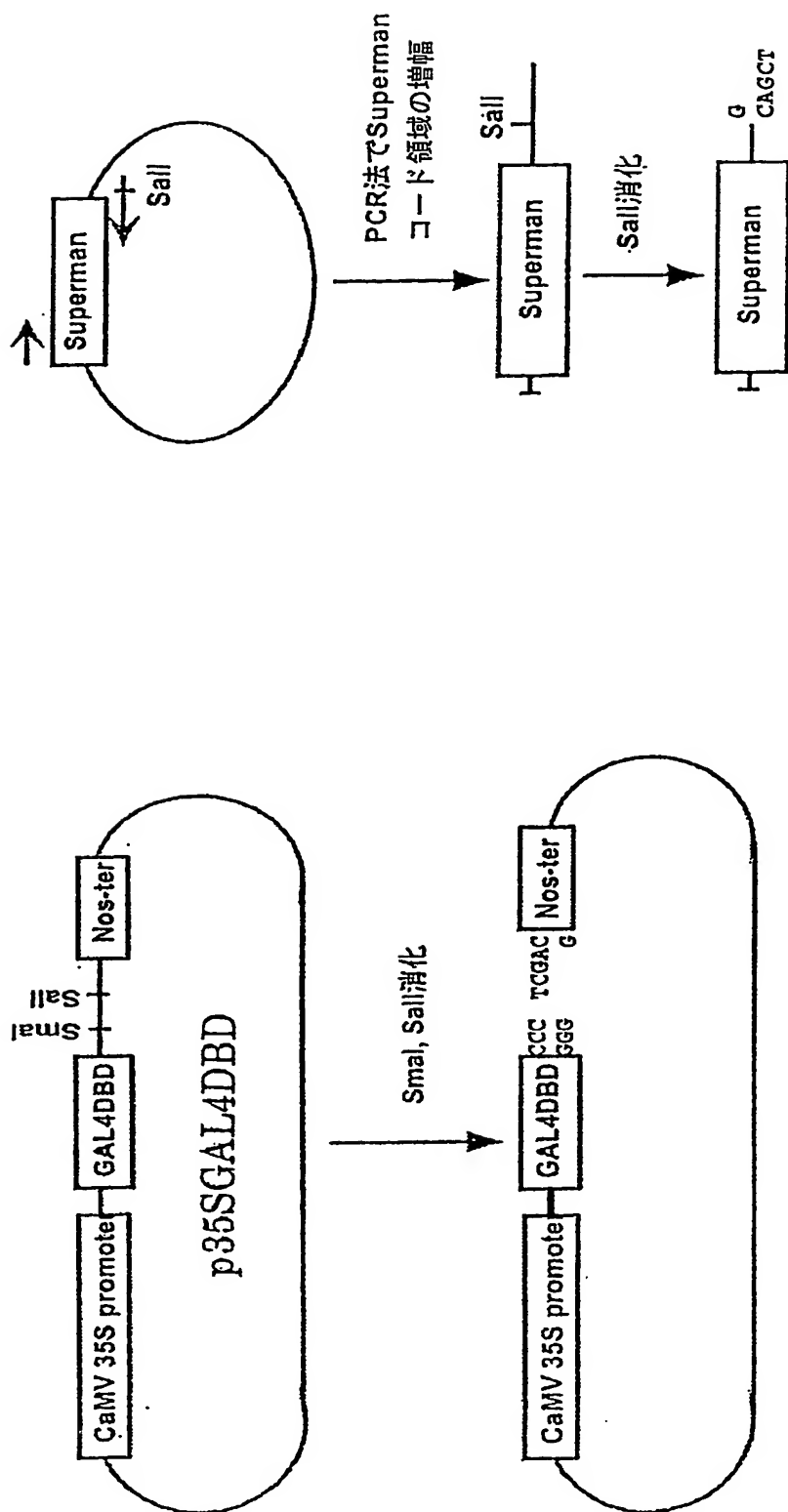
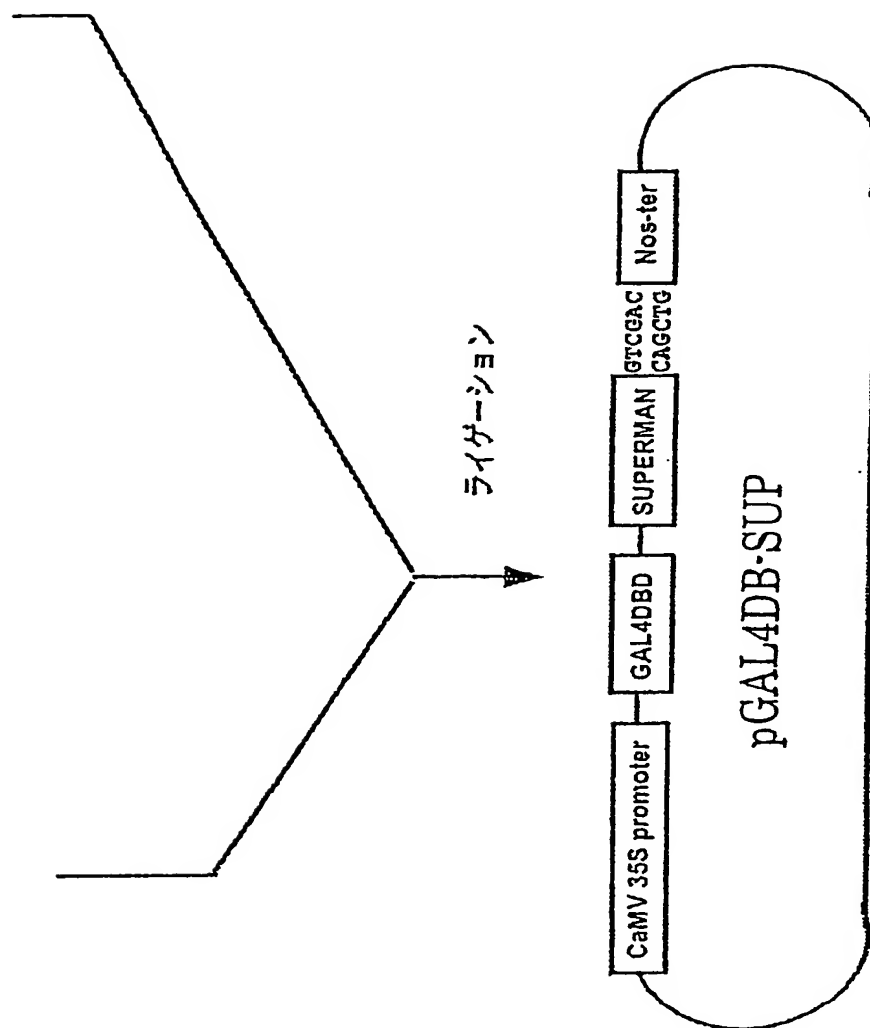


図5



5/1/19

図5



5/2/19

差替え用紙(規則26)

図6

エフェクタープラスミドの構築

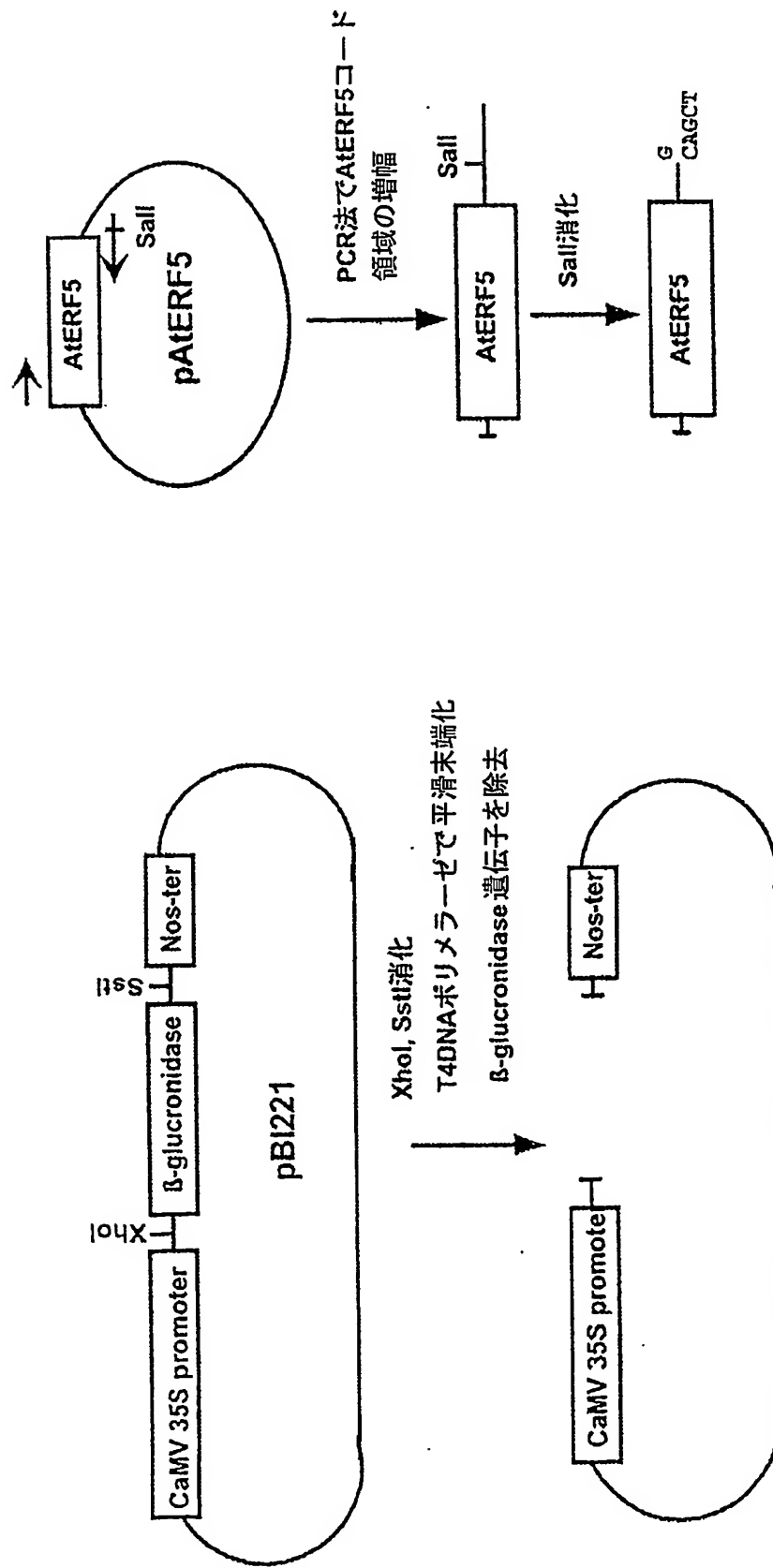




図6

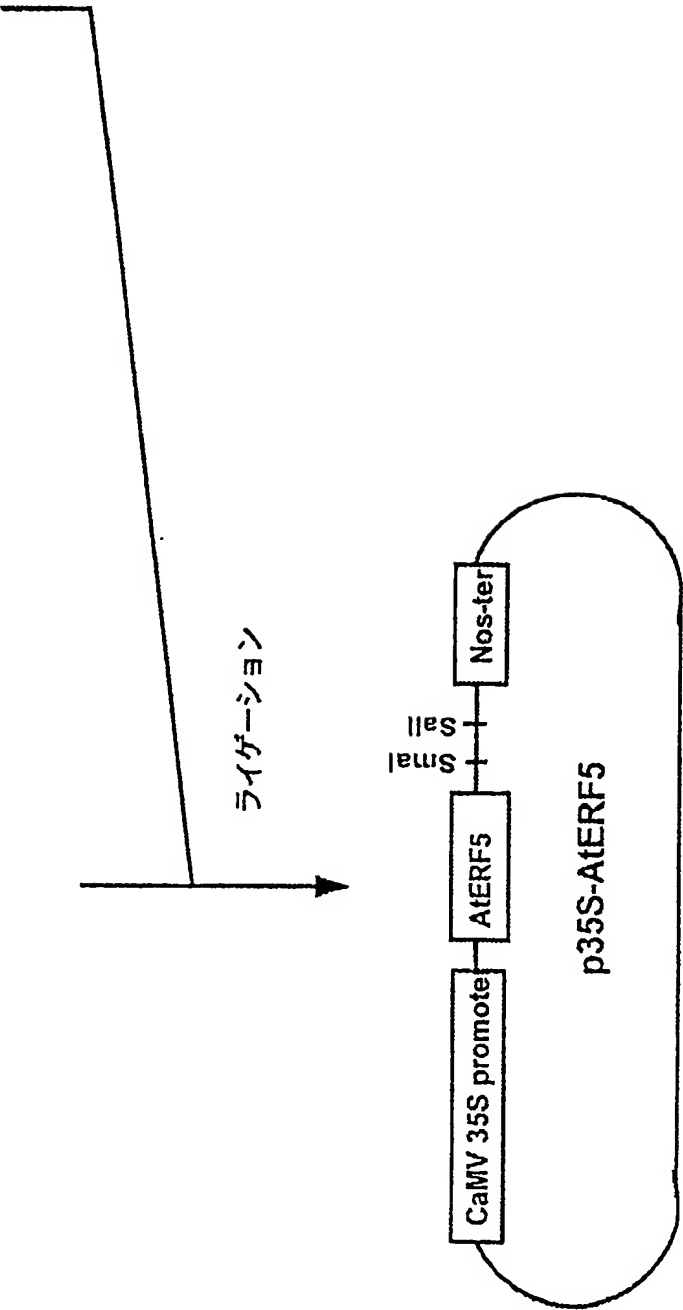


図 7

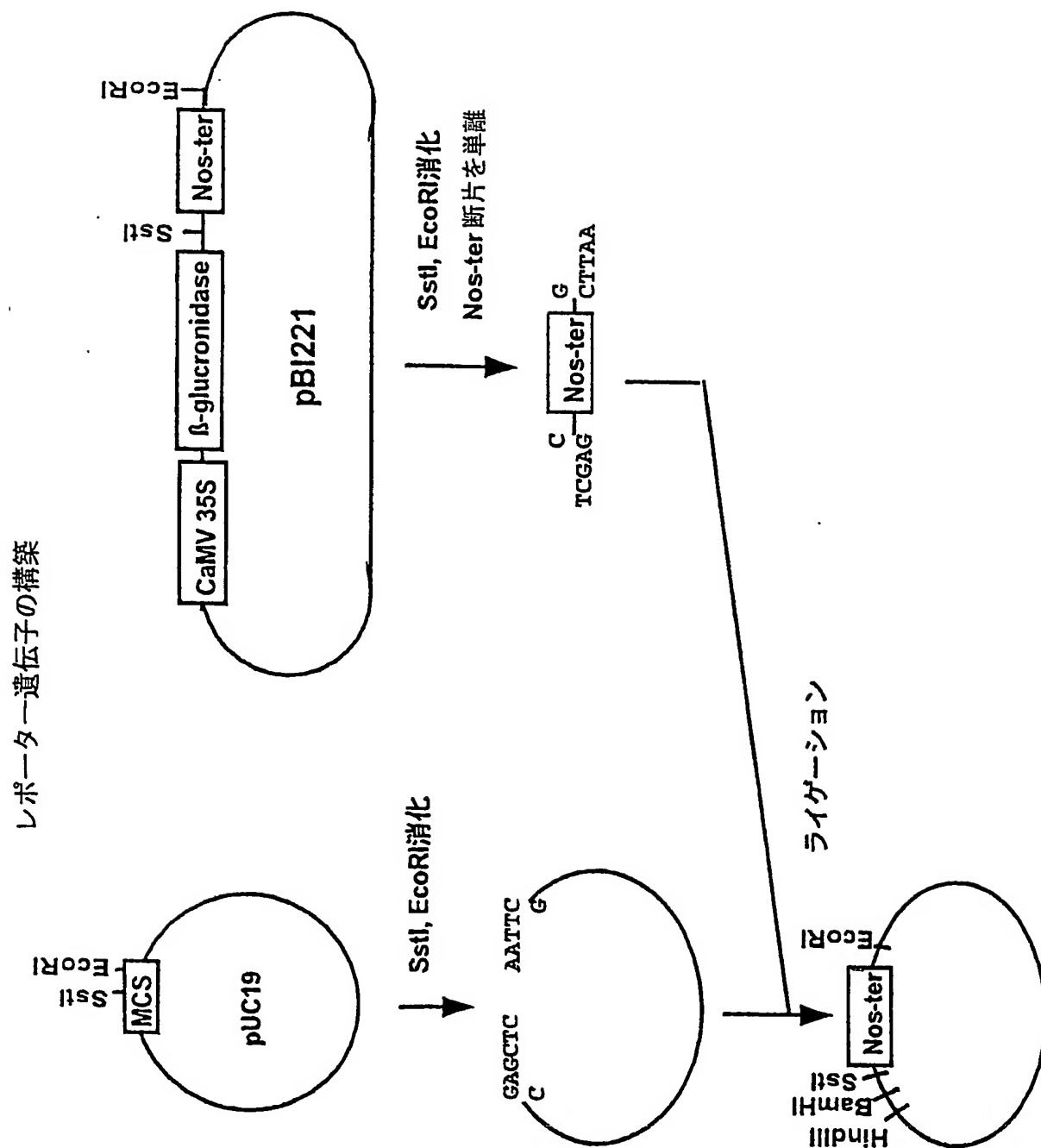
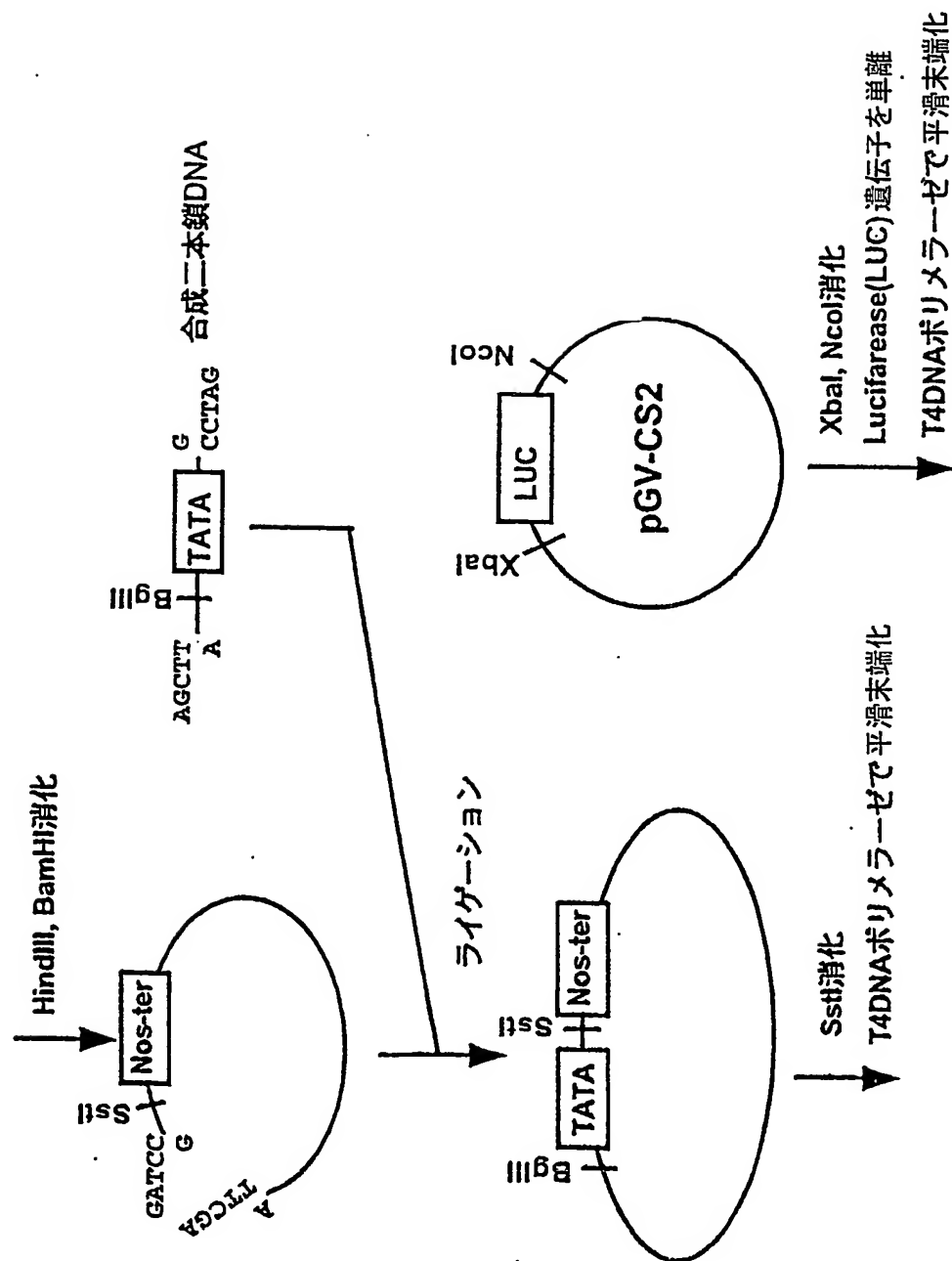


図7



7/1/19

差替え用紙(規則26)

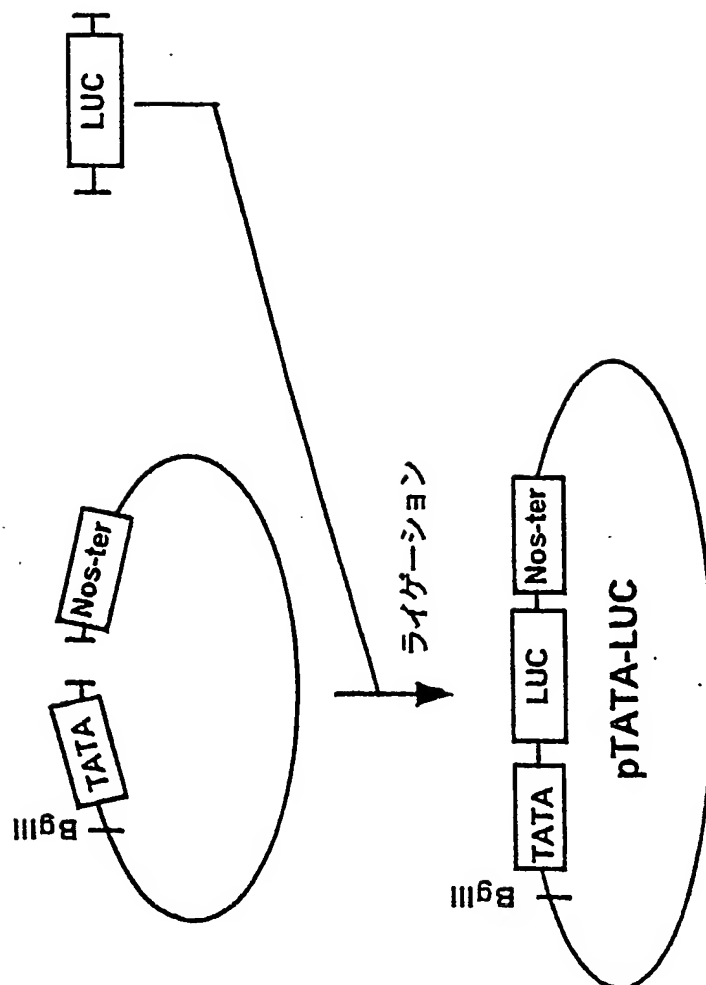


図7

7/2/19

差替え用紙(規則26)

図7

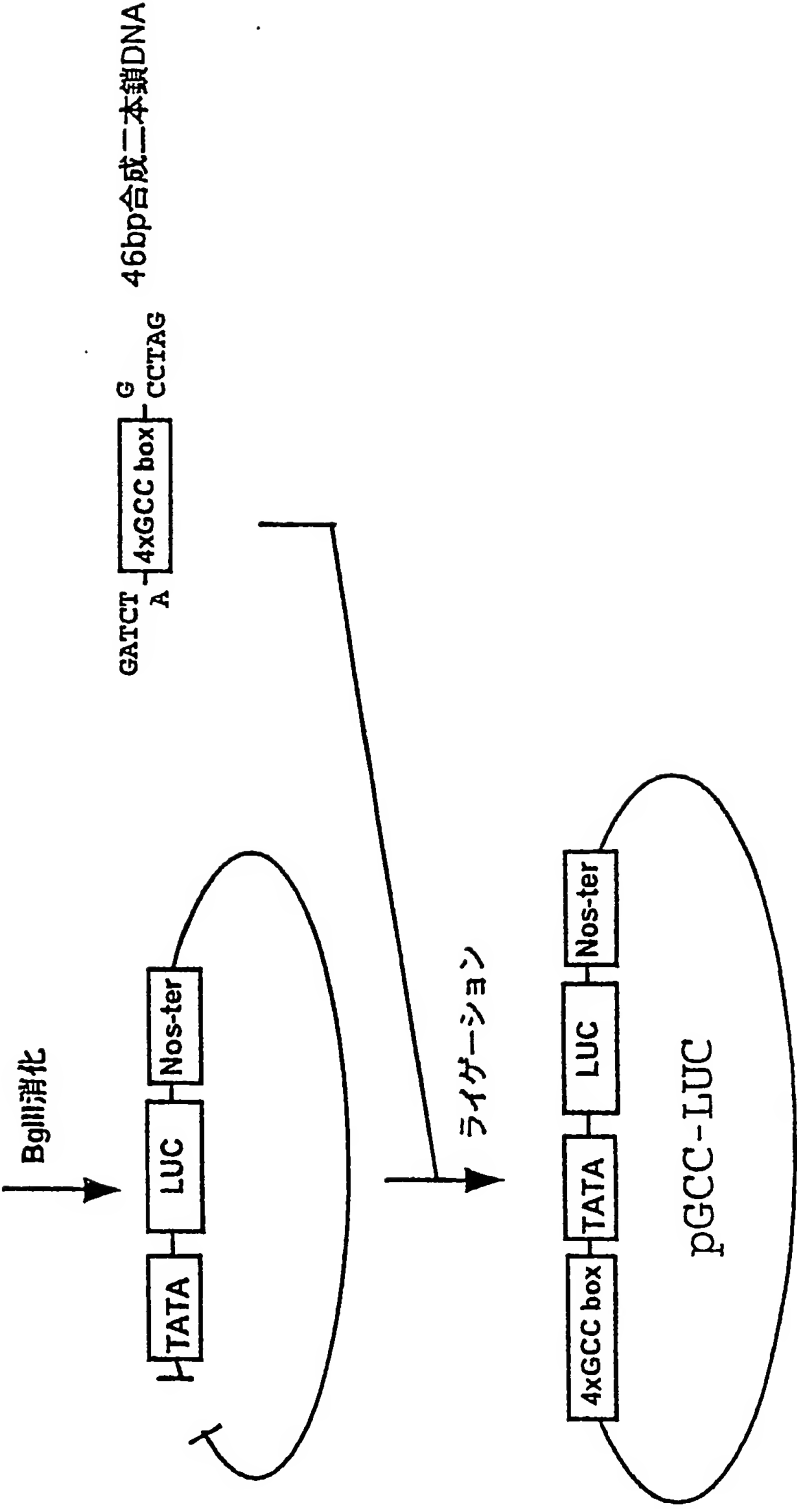
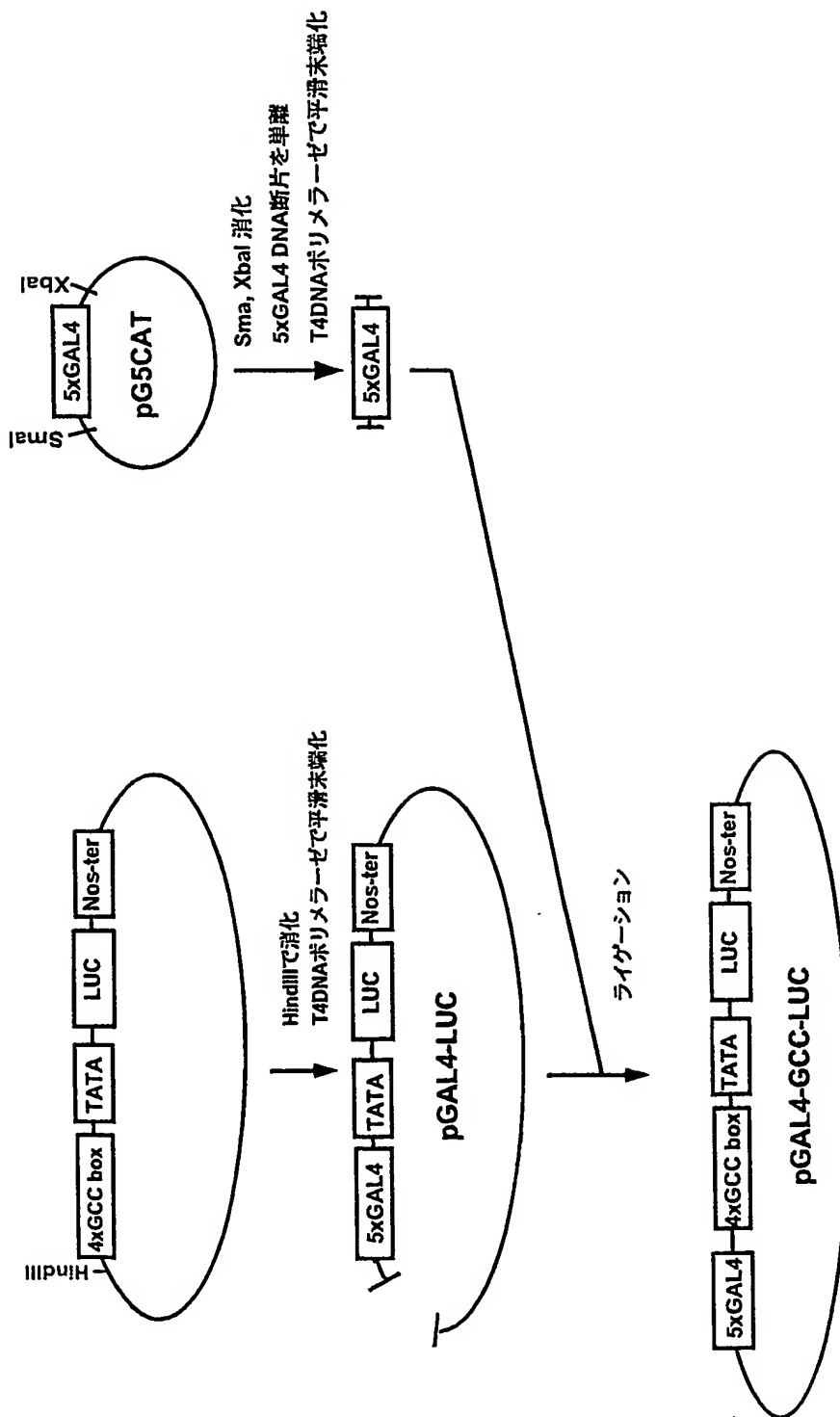


図 8



## 図9

A

Reporter

35S-GAL4-LUC

CaMV35S' - 5XGAL4 - 'TATA - LUC - Nos

Effector

SUP(D)

CaMV35S -  $\Omega$  - GAL4DB SUP(D) - Nos

B

Effector

None

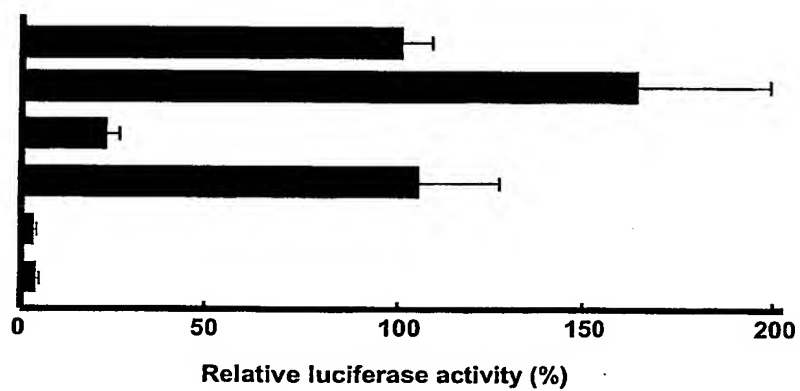
GAL4DB

1/204

1/174

156/204

175/204



# 10

## A

### Reporter

GAL4GCC-LUC

5 X GAL4-4 X GCC-TATA — **LUC** —Nos

### Effector

AtERF5

CaMV35S —Ω— **AtERF5** —Nos

GAL4DB

CaMV35S —Ω— **GAL4DB** —Nos

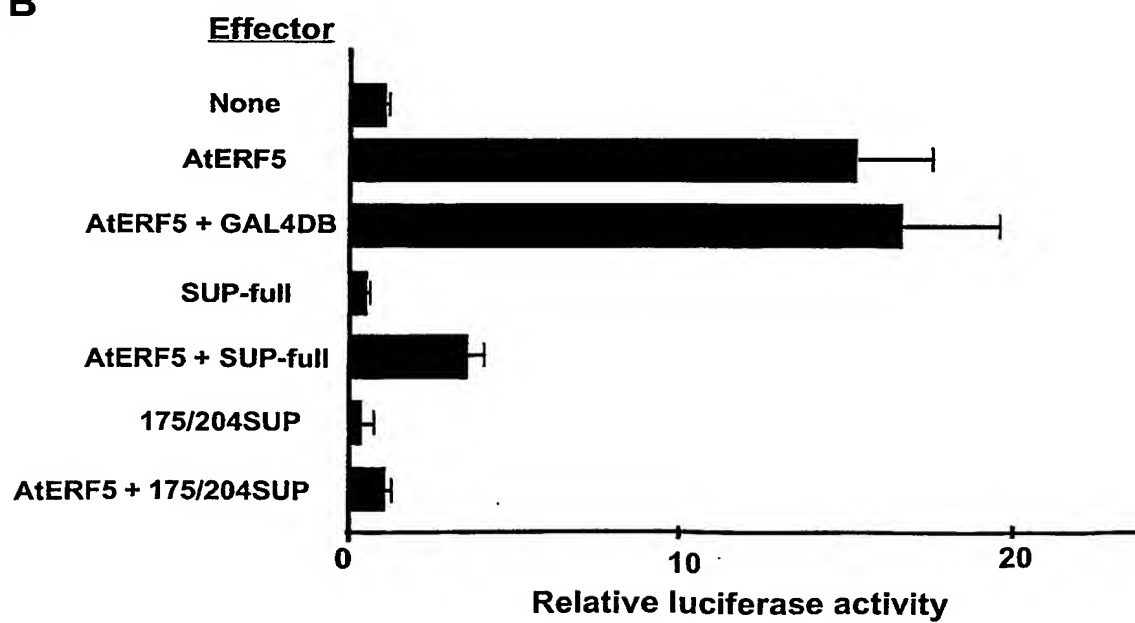
GAL4DB-SUP

CaMV35S —Ω— **GAL4DB** **1/204SUP** —Nos

GAL4DB-175/204SUP

CaMV35S —Ω— **GAL4DB** **174/204SUP** —Nos

## B





## 図 11

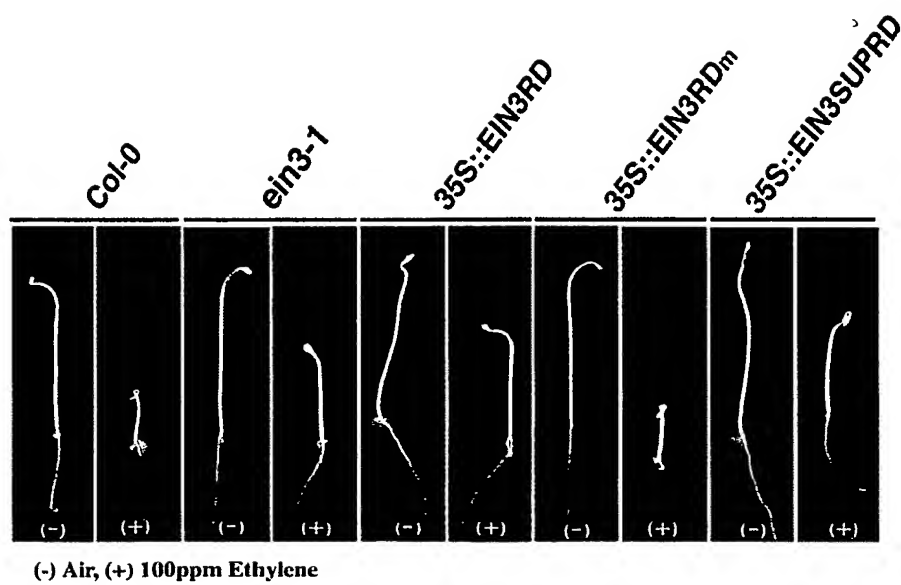


図 12

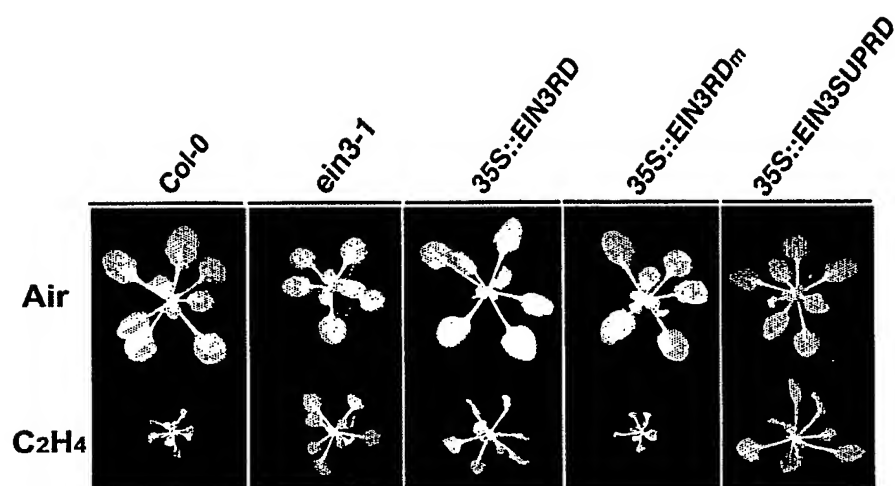
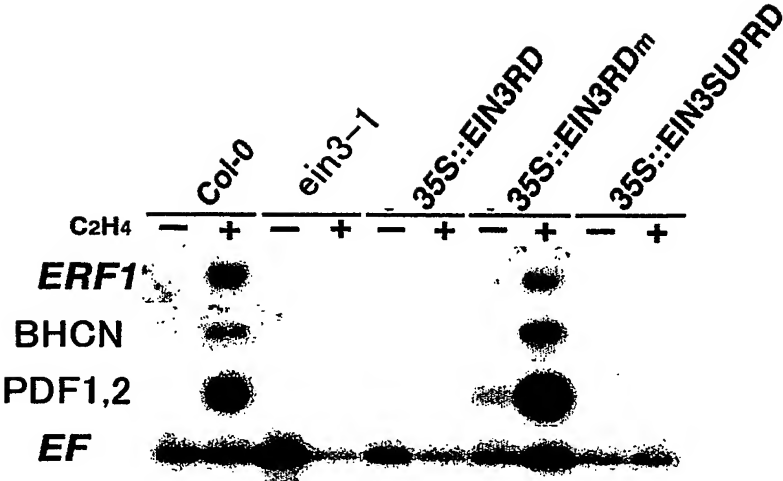


図13



## 図 14

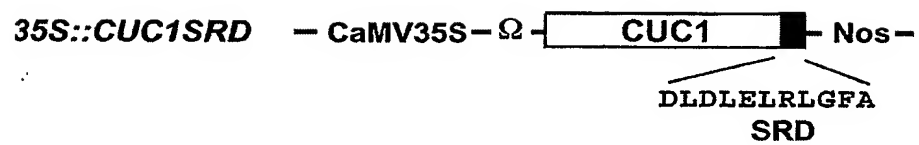


図 15



図16

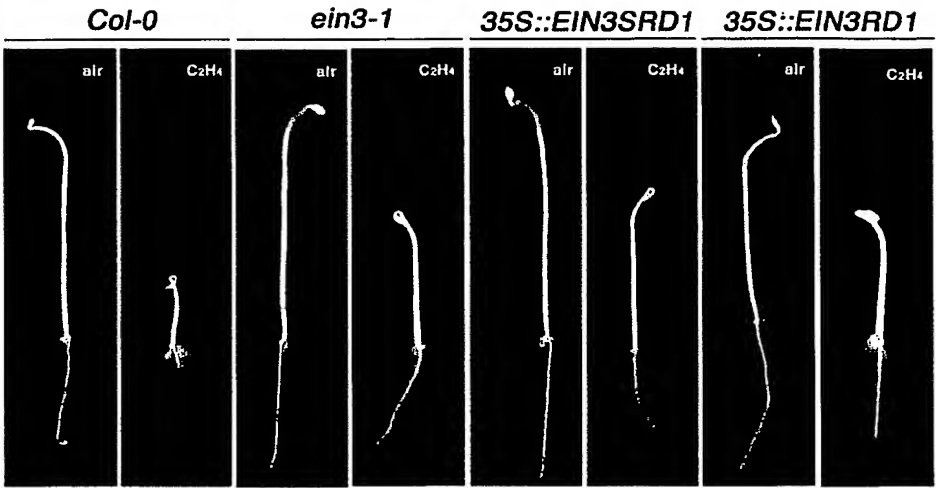


図17

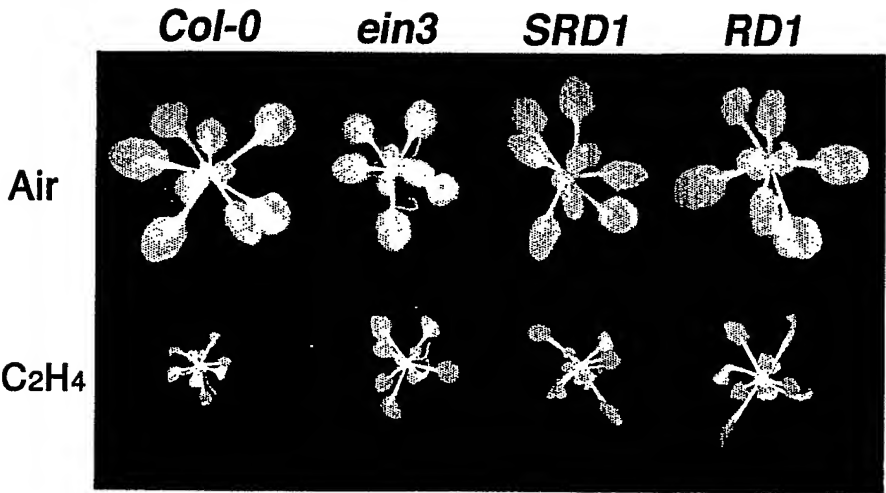
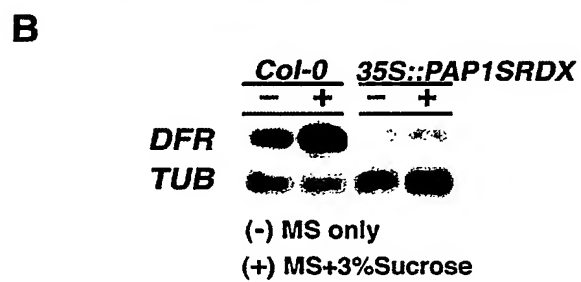
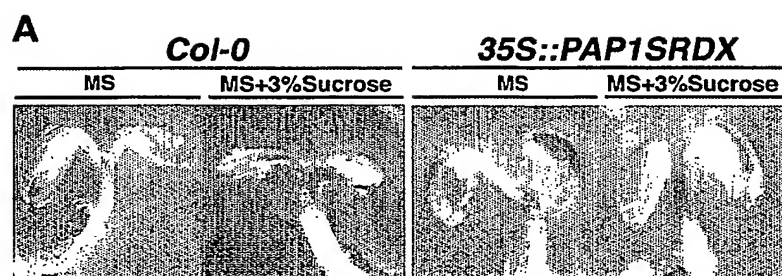
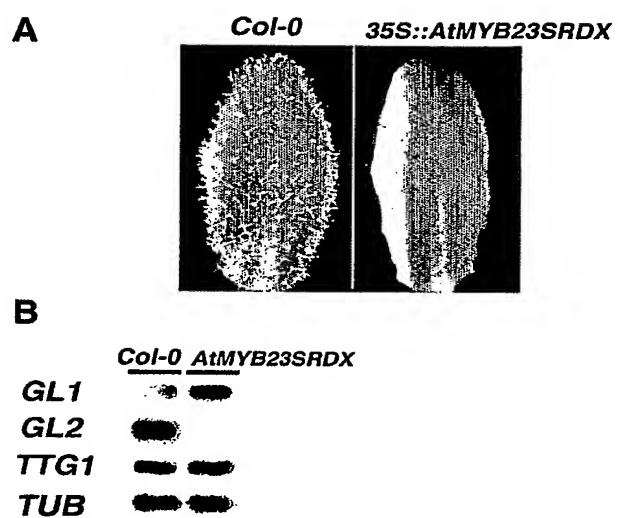


図18





## 図19



## SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<120> Transcription inhibitory gene and peptide

<130> PH-1684-PCT

<150> JP 2001-395487

<151> 2001-12-26

<150> JP 2001-395488

<151> 2001-12-26

<150> JP 2002-160671

<151> 2002-5-31

<160> 118

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> *Nicotiana tabacum*

<400> 1

Asp Leu Asp Leu Asn Leu Ala Pro Pro Met Glu Phe

1

5

10

<210> 2

<211> 41

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<400> 2

cgatcttgat cttaaccttg ctccacctat ggaattttga g

41

<210> 3

<211> 45

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<400> 3

tcgactcaaa attccatagg tggagcaagg ttaagatcaa gatcg

45

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<400> 4

Leu Asp Leu Asn Leu Ala Pro Pro Met Glu Phe

1

5

10

<210> 5

<211> 38

<212> DNA

<213> artificial

<400> 5

ccttgatctt aaccttgctc cacctatgga attttgag

38

<210> 6

<211> 42

<212> DNA

<213> artificial

&lt;400&gt; 6

tcgactcaaa attccatagg tggagcaagg ttaagatcaa gg

42

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial

&lt;400&gt; 7

Leu Asp Leu Asn Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1

5

10

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial

&lt;400&gt; 8

ccttgatctt aaccttgctg ctgctgctgc tgcttgag

38

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 42

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial

&lt;400&gt; 9

tcgactcaag cagcagcagc agcagcaagg ttaagatcaa gg

42

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 10

Leu Asp Leu Asn

<210> 11

<211> 17

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 11

cctggatcta aattaag

17

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 12

tcgacttaat ttagatccag g

21

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 13

Leu Asp Leu Asn Leu

1

5

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 14

cctggatcta aatctgtaag

20

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 15

tcgacttaca gatttagatc cagg

24

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 16

Leu Asp Leu Glu Leu Arg Leu Gly Phe Ala

1

5

10

<210> 17

<211> 35

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 17

cctggatcta gaactccgtt tgggtttcgc ttaag

35

<210> 18

<211> 39

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 18

tcgacttaag cgaaacccaa acggagttct agatccagg

39

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 19

Leu Asp Leu Glu Leu Gly Phe Ala

1

5

<210> 20

<211> 39

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 20

cctggatcta gaactcgggt tcgcttaag

39

<210> 21

<211> 43

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 21

tcgacttaag cgaaaccgag ttctagatcc agg

43

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 22

Leu Glu Leu Asp Leu Ala Ala Ala Ala Ala

1

5

10

<210> 23

<211> 38

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 23

actggaacta gatctagctg cagctgcagc tgcttaag 38

<210> 24

<211> 42

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 24

tcgacttaag cagctgcagc tgcagctaga tctagttcca gt 42

<210> 25

<211> 65

<212> DNA

<213> Cauliflower mosaic virus

<400> 25

agcttagatc tgcaagaccc ttcctctata taaggaagtt catttcattt ggagaggaca 60

cgctg 65

<210> 26

<211> 65

<212> DNA

<213> Cauliflower mosaic virus

<400> 26

gatccagcgt gtcctctcca aatgaaatga acttccttat atagaggaag ggtcttgcag 60

atcta 65



<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> Cauliflower mosaic virus

<400> 27

cgccagggtt ttcccagtca cgac

24

<210> 28

<211> 37

<212> DNA

<213> Cauliflower mosaic virus

<400> 28

aagggttaagc ttaaggatag tgggattgtg cgtcac

37

<210> 29

<211> 19

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 29

gatggagaga tcaaacagc

19

<210> 30

<211> 32

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 30

gataaagtta ttaccgtcga ctttaagcgaa ac

32

<210> 31

<211> 615

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1) (615)

<223>

<300>

<301> Sakai, H., Medrano, L. J. and Meyerowitz, E. M.

<302> Role of SUPERMAN in maintaining Arabidopsis floral whorl boundaries

<303> Nature

<304> 378

<305> 6553

<306> 199-203

<307> 1995

<308> U38946

<400> 31

atg gag aga tca aac agc ata gag ttg agg aac agc ttc tat ggc cgt 48

Met Glu Arg Ser Asn Ser Ile Glu Leu Arg Asn Ser Phe Tyr Gly Arg

1 5 10 15

gca aga act tca cca tgg agc tat gga gat tat gat aat tgc caa cag 96

Ala Arg Thr Ser Pro Trp Ser Tyr Gly Asp Tyr Asp Asn Cys Gln Gln

20 25 30

gat cat gat tat ctt cta ggg ttt tca tgg cca cca aga tcc tac act 144

Asp His Asp Tyr Leu Leu Gly Phe Ser Trp Pro Pro Arg Ser Tyr Thr

35 40 45

tgc agc ttc tgc aaa agg gaa ttc aga tcg gct caa gca ctt ggt ggc 192

Cys Ser Phe Cys Lys Arg Glu Phe Arg Ser Ala Gln Ala Leu Gly Gly

50 55 60

cac atg aat gtt cac aga aga gac aga gca aga ctc aga tta caa cag 240

His Met Asn Val His Arg Arg Asp Arg Ala Arg Leu Arg Leu Gln Gln

$\langle 210 \rangle$  32  
 $\langle 211 \rangle$  18  
 $\langle 212 \rangle$  DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 32

gaatgatgaa atcatcag

18

<210> 33

<211> 29

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 33

catggcgact cctaacgaag tatctgcac

29

<210> 34

<211> 39

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 34

atcggttcaaa aactcaaggc taactaatca acaacggtc

39

<210> 35

<211> 65

<212> DNA

<213> Cauliflower mosaic virus

<400> 35

agcttagatc tgcaagaccc ttctctata taaggaagtt catttcattt ggagaggaca 60

cgctg

65

<210> 36

<211> 65

<212> DNA

<213> Cauliflower mosaic virus

<400> 36

gatccagcgt gtcctctcca aatgaaatga acttccttat atagaggaag ggtcttgag 60  
atcta 65

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> Cauliflower mosaic virus

<400> 37

cgccagggtt ttcccagtca cgac 24

<210> 38

<211> 37

<212> DNA

<213> Cauliflower mosaic virus

<400> 38

aagggtaacg ttaaggatag tgggattgtg cgatcgc 37

<210> 39

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 39

gatcagccgc cgatcagccg ccgatcagcc gccgatcagc cgcc 44

<210> 40

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 40

tcggccggct agtcggcggc tagtcggcgg ctagtcggcg ggatc 44

<210> 41

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 41

gatccacaat taccaacaac aacaaacaac aaacaacatt acaattacag atcccggggg 60  
taccgtcgac gagctc 76

<210> 42

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 42

cgtcgacggt acccccggga tctgtaattg taatgttggt tgttgttgtg tgttgttgtt 60  
ggtaattgtg 70

<210> 43

<211> 21

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 43

aatgatgttt aatgagatgg g 21

<210> 44

<211> 22

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 44

atgaatcccc gggatattat tc 22

<210> 45

<211> 19

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 45

cgacactgca gatcacaac

19

<210> 46

<211> 30

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 46

atcccgaacc atatggatac atcttgctgc

30

<210> 47

<211> 24

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 47

agtgggtcct actgtgtcgg actc

24

<211> 48

<212> 39

<213> DNA

<400> 48

ccaaataaca ttatcggtcg actcaaaatt ccataggtg

39

<210> 49

<211> 35

<212> PRT

<213> *Nicotiana tabacum*

<400> 49

Val Gly Pro Thr Val Ser Asp Ser Ser Ser Ala Val Glu Glu Asn Gly

1 5 10 15

Tyr Asp Gly Lys Arg Asp Ile Ala Leu Ala Leu Asn Leu Ala Pro Pro

20 25 30

Met Glu Phe

35

<210> 50

<211> 111

<212> DNA

<213> *Nicotiana tabacum*

<400> 50

agtgggtcct actgtgtcgg actcgtcctc tgcagtggaa gagaaccaat atgatgggga 60

aaagaggaat tgatcttgat cttaccttg ctccacctat ggaattttga g 111

<210> 51

<211> 116

<212> DNA

<213> *Nicotiana tabacum*

<400> 51

tgcactcaaa attccatagg tggagcaagg ttaagatcaa gatcaattcc tcttttcccc 60

catcatattg gtctcttcc actgcagagg acgagtccga cacagtagga cccact 116

<210> 52

<211> 1887

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*



&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) (1887)

&lt;223&gt;

&lt;300&gt;

&lt;301&gt;

Chao, Q., Rothenberg, M., Solano, R., Roman, G., Terzaghi, W. and Ecker, J. R.

&lt;302&gt;

Activation of the ethylene gas response pathway in Arabidopsis by the nuclear protein  
ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins

&lt;303&gt; Cell

&lt;304&gt; 89

&lt;305&gt; (7)

&lt;306&gt; 1133-1144

&lt;307&gt; (1997)

&lt;308&gt; AF004216

&lt;400&gt; 52

atg atg ttt aat gag atg gga atg tgt gga aac atg gat ttc ttc tct 48  
Met Met Phe Asn Glu Met Gly Met Cys Gly Asn Met Asp Phe Phe Ser  
1 5 10 15  
tct gga tca ctt ggt gaa gtt gat ttc tgt cct gtt cca caa gct gag 96  
Ser Gly Ser Leu Gly Glu Val Asp Phe Cys Pro Val Pro Gln Ala Glu  
20 25 30  
cct gat tcc att gtt gaa gat gac tat act gat gat gag att gat gtt 144  
Pro Asp Ser Ile Val Glu Asp Asp Tyr Thr Asp Asp Glu Ile Asp Val  
35 40 45  
gat gaa ttg gag agg agg atg tgg aga gac aaa atg cgg ctt aaa cgt 192  
Asp Glu Leu Glu Arg Arg Met Trp Arg Asp Lys Met Arg Leu Lys Arg  
50 55 60  
ctc aag gag cag gat aag ggt aaa gaa ggt gtt gat gct gct aaa cag 240

Leu Lys Glu Gln Asp Lys Gly Lys Glu Gly Val Asp Ala Ala Lys Gln  
 65                                      70                                      75                                      80  
 agg cag tct caa gag caa gct agg agg aag aaa atg tct aga gct caa 288  
 Arg Gln Ser Gln Glu Gln Ala Arg Arg Lys Lys Met Ser Arg Ala Gln  
                                     85                                      90                                      95  
 gat ggg atc ttg aag tat atg ttg aag atg atg gaa gtt tgt aaa gct 336  
 Asp Gly Ile Leu Lys Tyr Met Leu Lys Met Met Glu Val Cys Lys Ala  
                                     100                                      105                                      110  
 caa ggc ttt gtt tat ggg att att ccg gag aat ggg aag cct gtg act 384  
 Gln Gly Phe Val Tyr Gly Ile Ile Pro Glu Asn Gly Lys Pro Val Thr  
                                     115                                      120                                      125  
 ggt gct tct gat aat tta agg gag tgg tgg aaa gat aag gtt agg ttt 432  
 Gly Ala Ser Asp Asn Leu Arg Glu Trp Trp Lys Asp Lys Val Arg Phe  
                                     130                                      135                                      140  
 gat cgt aat ggt cct gcg gct att acc aag tat caa gcg gag aat aat 480  
 Asp Arg Asn Gly Pro Ala Ala Ile Thr Lys Tyr Gln Ala Glu Asn Asn  
                                     145                                      150                                      155                                      160  
 atc ccg ggg att cat gaa ggt aat aac ccg att gga ccg act cct cat 528  
 Ile Pro Gly Ile His Glu Gly Asn Asn Pro Ile Gly Pro Thr Pro His  
                                     165                                      170                                      175  
 acc ttg caa gag ctt caa gac acg act ctt gga tcg ctt ttg tct gcg 576  
 Thr Leu Gln Glu Leu Gln Asp Thr Thr Leu Gly Ser Leu Leu Ser Ala  
                                     180                                      185                                      190  
 ttg atg caa cac tgt gat cct cct cag aga cgt ttt cct ttg gag aaa 624  
 Leu Met Gln His Cys Asp Pro Pro Gln Arg Arg Phe Pro Leu Glu Lys  
                                     195                                      200                                      205  
 gga gtt cct cct ccg tgg tgg cct aat ggg aaa gag gat tgg tgg cct 672  
 Gly Val Pro Pro Pro Trp Trp Pro Asn Gly Lys Glu Asp Trp Trp Pro  
                                     210                                      215                                      220  
 caa ctt ggt ttg cct aaa gat caa ggt cct gca cct tac aag aag cct 720

18/44

Asp Leu Asn Thr Ile Met Asp Arg Thr Val Phe Thr Cys Glu Asn Leu  
385 390 395 400  
ggg tgt gcg cac agc gaa atc agc cgg gga ttt ctg gat agg aat tcg 1248  
Gly Cys Ala His Ser Glu Ile Ser Arg Gly Phe Leu Asp Arg Asn Ser  
405 410 415  
aga gac aac cat caa ctg gca tgt cca cat cga gac agt cgc tta ccg 1296  
Arg Asp Asn His Gln Leu Ala Cys Pro His Arg Asp Ser Arg Leu Pro  
420 425 430  
tat gga gca gca cca tcc agg ttt cat gtc aat gaa gtt aag cct gta 1344  
Tyr Gly Ala Ala Pro Ser Arg Phe His Val Asn Glu Val Lys Pro Val  
435 440 445  
gtt gga ttt cct cag cca agg cca gtg aac tca gta gcc caa cca att 1392  
Val Gly Phe Pro Gln Pro Arg Pro Val Asn Ser Val Ala Gln Pro Ile  
450 455 460  
gac tta acg ggt ata gtt cct gaa gat gga cag aag atg atc tca gag 1440  
Asp Leu Thr Gly Ile Val Pro Glu Asp Gly Gln Lys Met Ile Ser Glu  
465 470 475 480  
ctc atg tcc atg tac gac aga aat gtc cag agc aac caa acc tct atg 1488  
Leu Met Ser Met Tyr Asp Arg Asn Val Gln Ser Asn Gln Thr Ser Met  
485 490 495  
gtc atg gaa aat caa agc gtg tca ctg ctt caa ccc aca gtc cat aac 1536  
Val Met Glu Asn Gln Ser Val Ser Leu Leu Gln Pro Thr Val His Asn  
500 505 510  
cat caa gaa cat ctc cag ttc cca gga aac atg gtg gaa gga agt ttc 1584  
His Gln Glu His Leu Gln Phe Pro Gly Asn Met Val Glu Gly Ser Phe  
515 520 525  
ttt gaa gac ttg aac atc cca aac aga gca aac aac aac aac agc agc 1632  
Phe Glu Asp Leu Asn Ile Pro Asn Arg Ala Asn Asn Asn Asn Ser Ser  
530 535 540  
aac aat caa acg ttt ttt caa ggg aac aac aac aac aac aat gtg ttt 1696

Asn Asn Gln Thr Phe Phe Gln Gly Asn Asn Asn Asn Asn Val Phe  
545 550 555 560  
aag ttc gac act gca gat cac aac aac ttt gaa gct gca cat aac aac 1728  
Lys Phe Asp Thr Ala Asp His Asn Asn Phe Glu Ala Ala His Asn Asn  
565 570 575  
aac aat aac agt agc ggc aac agg ttc cag ctt gtg ttt gat tcc aca 1776  
Asn Asn Asn Ser Ser Gly Asn Arg Phe Gln Leu Val Phe Asp Ser Thr  
580 585 590  
ccg ttc gac atg gcg tca ttc gat tac aga gat gat atg tcg atg cca 1824  
Pro Phe Asp Met Ala Ser Phe Asp Tyr Arg Asp Asp Met Ser Met Pro  
595 600 605  
gga gta gta gga acg atg gat gga atg cag cag aag cag caa gat gta 1872  
Gly Val Val Gly Thr Met Asp Gly Met Gln Gln Lys Gln Gln Asp Val  
610 615 620  
tcc ata tgg ttc taa 1887  
Ser Ile Trp Phe  
625

<210> 53

<211> 678

<212> DNA, PRT

<213> *Nicotiana tabacum*

<220>

<221> CDS

<222> (1) (678)

<223>

<300>

<301> Ohme-Takagi, M. and Shinshi, H.

<302>

Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive

element

<303> Plant Cell

<304> 7

<305> (2)

<306> 173-182

<307> 1995

<308> D38124

<400> 53

atg gct gtc aaa aat aag gtt agt aat ggc aat ctg aaa gga gga aat 48

Met Ala Val Lys Asn Lys Val Ser Asn Gly Asn Leu Lys Gly Gly Asn

1 5 10 15

gtg aaa aca gat gga gtt aag gag gtt cac tac aga ggt gta agg aag 96

Val Lys Thr Asp Gly Val Lys Glu Val His Tyr Arg Gly Val Arg Lys

20 25 30

agg cca tgg ggt cgg tat gca gct gaa atc cgt gac ccg ggt aag aag 144

Arg Pro Trp Gly Arg Tyr Ala Ala Glu Ile Arg Asp Pro Gly Lys Lys

35 40 45

agt cgg gtc tgg tta ggt act ttc gac acg gcg gaa gag gcg gct aag 192

Ser Arg Val Trp Leu Gly Thr Phe Asp Thr Ala Glu Glu Ala Ala Lys

50 55 60

gcg tac gac acc gcc gct cga gag ttt cgt gga ccc aaa gca aaa act 240

Ala Tyr Asp Thr Ala Ala Arg Glu Phe Arg Gly Pro Lys Ala Lys Thr

65 70 75 80

aac ttc cct tca ccg acg gag aat cag agc cca agt cac agc agc acc 288

Asn Phe Pro Ser Pro Thr Glu Asn Gln Ser Pro Ser His Ser Ser Thr

85 90 95

gtg gag tcc tct agt gga gag aat ggt gtt cac gcg ccg cct cat gcg 336

Val Glu Ser Ser Ser Gly Glu Asn Gly Val His Ala Pro Pro His Ala

100 105 110

ccg ctc gag ctg gat ctc acg cgc cgt ctt ggc tcc gtt gct gca gat 384

Pro Leu Glu Leu Asp Leu Thr Arg Arg Leu Gly Ser Val Ala Ala Asp  
115 120 125  
ggc ggt gac aac tgt cgc cgt tct ggg gaa gtt ggg tac ccg att ttc 432  
Gly Gly Asp Asn Cys Arg Arg Ser Gly Glu Val Gly Tyr Pro Ile Phe  
130 135 140  
cac cag cag ccg act gtg gcg gtt ctg cca aat ggc cag ccg gtt ctg 480  
His Gln Gln Pro Thr Val Ala Val Leu Pro Asn Gly Gln Pro Val Leu  
145 150 155 160  
ctc ttt gat tct ttg tgg cgg gcg gga gtt gtt aac agg cct cag cct 528  
Leu Phe Asp Ser Leu Trp Arg Ala Gly Val Val Asn Arg Pro Gln Pro  
165 170 175  
tac cat gta acg ccg atg ggg ttt aac ggc gtt aac gcc gga gtg ggt 576  
Tyr His Val Thr Pro Met Gly Phe Asn Gly Val Asn Ala Gly Val Gly  
180 185 190  
cct act gtg tcg gac tcg tcc tct gca gtg gaa gag aac caa tat gat 624  
Pro Thr Val Ser Asp Ser Ser Ser Ala Val Glu Glu Asn Gln Tyr Asp  
195 200 205  
ggg aaa aga gga att gat ctt gat ctt aac ctt gct cca cct atg gaa 672  
Gly Lys Arg Gly Ile Asp Leu Asp Leu Asn Leu Ala Pro Pro Met Glu  
210 215 220  
ttt tga 678  
Phe  
225

<210> 54

<211> 933

<212> DNA, PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221>

<222> (1) (933)

<223>

<300>

<301> Takada, S., Hibara, K., Ishida, T., Tasaka, M.

<302>

The cup-shaped cotyledon1 of Arabidopsis regulates shoot apical meristem formation

<303> Development

<304> 128

<305>

<306> 1127-1135

<307> 2001

<308> AB049069

<400> 54

atg gat gtt gat gtg ttt aac ggt tgg ggg agg cca aga ttt gaa gat 48

Met Asp Val Asp Val Phe Asn Gly Trp Gly Arg Pro Arg Phe Glu Asp

5

10

15

gaa tcc ctt atg cca cct ggg ttt agg ttt cat cca act gat gaa gag 96

Glu Ser Leu Met Pro Pro Gly Phe Arg Phe His Pro Thr Asp Glu Glu

20

25

30

ctg atc act tac tat ctc ctc aag aag gtt ctt gac tct aat ttc tct 144

Leu Ile Thr Tyr Tyr Leu Leu Lys Lys Val Leu Asp Ser Asn Phe Ser

35

40

45

tgt gcc gcc att tct caa gtt gat ctc aac aag tct gag cct tgg gag 192

Cys Ala Ala Ile Ser Gln Val Asp Leu Asn Lys Ser Glu Pro Trp Glu

50

55

60

ctt cct gag aaa gcg aaa atg ggg gag aag gag tgg tac ttc ttc aca 240

Leu Pro Glu Lys Ala Lys Met Gly Glu Lys Glu Trp Tyr Phe Phe Thr

65

70

75

80

cta aga gac cgt aaa tac cca acg gga ctg aga acg aac aga gca aca 288

Leu Arg Asp Arg Lys Tyr Pro Thr Gly Leu Arg Thr Asn Arg Ala Thr



85 90 95  
gaa gct ggt tac tgg aaa gcc act ggt aaa gac aga gag atc aaa agc 336  
Glu Ala Gly Tyr Trp Lys Ala Thr Gly Lys Asp Arg Glu Ile Lys Ser  
100 105 110  
tca aag aca aaa tca ctt ctc ggg atg aag aaa act ctt gtc ttt tac 384  
Ser Lys Thr Lys Ser Leu Leu Gly Met Lys Lys Thr Leu Val Phe Tyr  
115 120 125  
aaa ggc aga gct cct aaa gga gag aag agt tgt tgg gtc atg cat gag 432  
Lys Gly Arg Ala Pro Lys Gly Glu Lys Ser Cys Trp Val Met His Glu  
130 135 140  
tat cgc ctt gac ggc aaa ttc tct tac cat tac att tcc tcc tcc gct 480  
Tyr Arg Leu Asp Gly Lys Phe Ser Tyr His Tyr Ile Ser Ser Ser Ala  
145 150 155 160  
aag gat gaa tgg gtt ctc tgt aaa gtt tgt ctg aaa agc ggc gta gtt 528  
Lys Asp Glu Trp Val Leu Cys Lys Val Cys Leu Lys Ser Gly Val Val  
165 170 175  
agt aga gag acg aac ttg atc tct tct tct tct tct tct gcc gtc acc 576  
Ser Arg Glu Thr Asn Leu Ile Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Val Thr  
180 185 190  
gga gag ttc tcc tct gcc ggt tct gca att gct ccg atc atc aat acc 624  
Gly Glu Phe Ser Ser Ala Gly Ser Ala Ile Ala Pro Ile Ile Asn Thr  
195 200 205  
ttt gcg acg gag cac gtg tcc tgt ttc tcc aat aac tct gct gct cat 672  
Phe Ala Thr Glu His Val Ser Cys Phe Ser Asn Asn Ser Ala Ala His  
210 215 220  
acc gat gcg agc ttt cat aca ttc ctt ccc gct cca ccg ccg tca ctg 720  
Thr Asp Ala Ser Phe His Thr Phe Leu Pro Ala Pro Pro Pro Ser Leu  
225 230 235 240  
ccc cca cgt cag cca cgt cac gtc ggt gat ggc gtg gcg ttt ggt cag 768  
Pro Pro Arg Gln Pro Arg His Val Gly Asp Gly Val Ala Phe Gly Gln

245 250 255  
ttt ctg gat ttg gga tca tcg gga cag att gat ttc gat gca gca gca 816  
Phe Leu Asp Leu Gly Ser Ser Gly Gln Ile Asp Phe Asp Ala Ala Ala  
260 265 270  
gca gcg ttc ttt ccg aat cta cct tct ctg cct ccc acg gtt ctt cct 864  
Ala Ala Phe Phe Pro Asn Leu Pro Ser Leu Pro Pro Thr Val Leu Pro  
275 280 285  
cct cct ccg tca ttt gca atg tac ggt gga ggc tcc ccc gcc gtg agt 912  
Pro Pro Pro Ser Phe Ala Met Tyr Gly Gly Gly Ser Pro Ala Val Ser  
290 295 300  
gtg tgg ccg ttt act ctc tga 933  
Val Trp Pro Phe Thr Leu \*\*\*  
305 310

<210> 55

<211> 60

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 55

ttaagcgaaa cccaaacgga gttctagatc cagatcgaga gttaaagggcc acacactcac 60

<210> 56

<211> 26

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 56

gggatggatg ttgatgtgtt taacgg

26

<210> 57

<211> 34

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 57

cctggatcta gaactccggtt tgggtttcgc ttaa

34

<210> 58

<211> 39

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 58

tcgacttaag cgaaacccaa acggagttct agatccagg

39

<210> 59

<211> 37

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 59

ccttgatctta accttgctc cacctatgga attttga

37

<210> 60

<211> 42

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 60

tcgactcaaa attccatagg tggagcaagg ttaagatcaa gg

42

<210> 61

<211> 30

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 61

Asn Asp Glu Ile Ile Ser Leu Glu Leu Glu Ile Gly Leu Ile Asn Glu

1

5

10

15

Ser Glu Gln Asp Leu Asp Leu Glu Leu Arg Leu Gly Phe Ala

20

25

30

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 62

aaaatggagg gtctgtccaa agggctgcga aaagg

35

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 63

atcaaatttc acagtctctc catcgaaaag actc

34

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 64

ctggatctgg atctagaact ccgtttgggt ttcgcttaag

40

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 65

CTTAAGCGAA ACCCAAACGG AGTTCTAGAT CCAGATCCAG

40

<210> 66

<211> 747

<212> DNA, PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221>

<222> (1) (747)

<223>

<300>

<301> Borevitz J.O., Xia Y., Blount J., Dixon R.A., Lamb C.

<302>

Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis.

<303> Plant Cell

<304> 12

<305>

<306> 2383-2393

<307> 2000

<308> AF325123

<400> 66

atg gag ggt tgc tcc aaa ggg ctg cga aaa ggt gct tgg act act gaa 48

MET Glu Gly Ser Ser Lys Gly Leu Arg Lys Gly Ala Trp Thr Thr Glu

1

5

10

15

gaa gat agt ctc ttg aga cag tgc att aat aag tat gga gaa ggc aaa 96

Glu Asp Ser Leu Leu Arg Gln Cys Ile Asn Lys Tyr Gly Glu Gly Lys

20	25	30	
tgg cac caa gtt cct gta aga gct ggg cta aac cgg tgc agg aaa agt	144		
Trp His Gln Val Pro Val Arg Ala Gly Leu Asn Arg Cys Arg Lys Ser			
35	40	45	
tgt aga tta aga tgg ttg aac tat ttg aag cca agt atc aag aga gga	192		
Cys Arg Leu Arg Trp Leu Asn Tyr Leu Lys Pro Ser Ile Lys Arg Gly			
50	55	60	
aaa ctt agc tct gat gaa gtc gat ctt ctt ctt cgc ctt cat agg ctt	240		
Lys Leu Ser Ser Asp Glu Val Asp Leu Leu Leu Arg Leu His Arg Leu			
65	70	75	80
cta ggg aat agg tgg tct tta att gct gga aga tta cct ggt cgg acc	288		
Leu Gly Asn Arg Trp Ser Leu Ile Ala Gly Arg Leu Pro Gly Arg Thr			
85	90	95	
gca aat gac gtc aag aat tac tgg aac act cat ctg agt aag aaa cat	336		
Ala Asn Asp Val Lys Asn Tyr Trp Asn Thr His Leu Ser Lys Lys His			
100	105	110	
gaa ccg tgt tgt aag ata aag atg aaa aag aga gac att acg ccc att	384		
Glu Pro Cys Cys Lys Ile Lys MET Lys Lys Arg Asp Ile Thr Pro Ile			
115	120	125	
cct aca aca ccg gca cta aaa aac aat gtt tat aag cct cga cct cga	432		
Pro Thr Thr Pro Ala Leu Lys Asn Asn Val Tyr Lys Pro Arg Pro Arg			
130	135	140	
tcc ttc aca gtt aac aac gac tgc aac cat ctc aat gcc cca cca aaa	480		
Ser Phe Thr Val Asn Asn Asp Cys Asn His Leu Asn Ala Pro Pro Lys			
145	150	155	160
gtt gac gtt aat cct cca tgc ctt gga ctt aac atc aat aat gtt tgt	528		
Val Asp Val Asn Pro Pro Cys Leu Gly Leu Asn Ile Asn Asn Val Cys			
165	170	175	
gac aat agt atc ata tac aac aaa gat aag aag aaa gac caa cta gtg	576		
Asp Asn Ser Ile Ile Tyr Asn Lys Asp Lys Lys Lys Asp Gln Leu Val			

180	185	190	
aat aat ttg att gat gga gat aat atg tgg tta gag aaa ttc cta gag			624
Asn Asn Leu Ile Asp Gly Asp Asn MET Trp Leu Glu Lys Phe Leu Glu			
195	200	205	
gaa agc caa gag gta gat att ttg gtt cct gaa gcg acg aca aca gaa			672
Glu Ser Gln Glu Val Asp Ile Leu Val Pro Glu Ala Thr Thr Thr Glu			
210	215	220	
aag ggg gac acc ttg gct ttt gac gtt gat caa ctt tgg agt ctt ttc			720
Lys Gly Asp Thr Leu Ala Phe Asp Val Asp Gln Leu Trp Ser Leu Phe			
225	230	235	240
gat gga gag act gtg aaa ttt gat tag			747
Asp Gly Glu Thr Val Lys Phe Asp			
245			

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 67

aaaatgagaa tgacaagaga tggaaaagaa catg	34
---------------------------------------	----

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 68

aaggcaatac ccattagtaa aatccatcat agtg	34
---------------------------------------	----

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 660

<212> DNA, PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221>

<222> (1) (660)

<223>

<300>

<301> Kirik V., Schnittger A., Radchuk V., Adler K., Hulskamp M. Baumlein H.

<302>

Ectopic expression of the Arabidopsis AtMYB23 gene induces differentiation of trichome cells.

<303> Developmental Biology

<304> 235

<305>

<306> 366-377

<307> 2001

<308> Z68158

<400> 69

atg aga atg aca aga gat gga aaa gaa cat gaa tac aag aaa ggt tta 48

MET Arg MET Thr Arg Asp Gly Lys Glu His Glu Tyr Lys Lys Gly Leu

1 5 10 15

tgg aca gtt gaa gaa gac aag atc ctc atg gat tat gtc cga act cat 96

Trp Thr Val Glu Glu Asp Lys Ile Leu MET Asp Tyr Val Arg Thr His

20 25 30

ggc cag ggc cac tgg aac cgc atc gcc aag aaa act ggg ctc aag aga 144

Gly Gln Gly His Trp Asn Arg Ile Ala Lys Lys Thr Gly Leu Lys Arg

35 40 45

tgt ggg aaa agc tgt agg ttg aga tgg atg aac tac tta agc cct aat 192

Cys Gly Lys Ser Cys Arg Leu Arg Trp MET Asn Tyr Leu Ser Pro Asn

50 55 60



gtt aac aga ggc aat ttt act gac caa gaa gaa gat ctc atc atc aga 240  
 Val Asn Arg Gly Asn Phe Thr Asp Gln Glu Glu Asp Leu Ile Ile Arg  
 65 70 75 80  
 ctc cac aag ctc ctc ggc aac aga tgg tcg ttg ata gcg aaa aga gtt 288  
 Leu His Lys Leu Leu Gly Asn Arg Trp Ser Leu Ile Ala Lys Arg Val  
 85 90 95  
 ccg gga aga aca gac aac caa gta aag aat tac tgg aac aca cat ctc 336  
 Pro Gly Arg Thr Asp Asn Gln Val Lys Asn Tyr Trp Asn Thr His Leu  
 100 105 110  
 agc aag aaa ctt ggt ctc gga gat cat tca act gcc gtc aaa gcc gca 384  
 Ser Lys Lys Leu Gly Leu Gly Asp His Ser Thr Ala Val Lys Ala Ala  
 115 120 125  
 tgc ggt gta gag tct cca ccg tct atg gcc ctt ata acc aca acg tcc 432  
 Cys Gly Val Glu Ser Pro Pro Ser MET Ala Leu Ile Thr Thr Thr Ser  
 130 135 140  
 tcc tct cat caa gag atc tcc ggt gga aaa aat tca act cta agg ttc 480  
 Ser Ser His Gln Glu Ile Ser Gly Gly Lys Asn Ser Thr Leu Arg Phe  
 145 150 155 160  
 gac act tta gtt gac gaa tcc aaa ctc aaa cca aaa tcc aaa cta gtc 528  
 Asp Thr Leu Val Asp Glu Ser Lys Leu Lys Pro Lys Ser Lys Leu Val  
 165 170 175  
 cac gca aca cca act gac gta gaa gtt gca gct acg gtt cca aat ctg 576  
 His Ala Thr Pro Thr Asp Val Glu Val Ala Ala Thr Val Pro Asn Leu  
 180 185 190  
 ttc gat acc ttt tgg gtt ctt gaa gac gac ttc gag ctt agt tca ctc 624  
 Phe Asp Thr Phe Trp Val Leu Glu Asp Asp Phe Glu Leu Ser Ser Leu  
 195 200 205  
 act atg atg gat ttt act aat ggg tat tgc ctt tga 660  
 Thr MET MET Asp Phe Thr Asn Gly Tyr Cys Leu  
 210 215

<210> 70

<211> 24

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 70

cgtggatcac agcaatacag agcc

24

<210> 71

<211> 25

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 71

cctcctgcac ttccacttcg tcttc

25

<210> 72

<211> 20

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 72

aaaaagatga caggatgggt

20

<210> 73

<211> 20

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 73

cccctgtttc tgtcttgta

20

<210> 74

<211> 26

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 74

gggatggata attcagctcc agattc

26

<210> 75

<211> 22

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 75

aactctaagg agctgcattt tg

22

<210> 76

<211> 33

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 76

gggatgagaa taaggagaag agatgaaaaa gag

33

<210> 77

<211> 33

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 77

aaggcagtac tcaatatcac tagaagcaaa att

33

<210> 78

<211> 33

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 78

atggccgtcg acatgtcttc caaacaaccc acc

33

<210> 79

<211> 30

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 79

gcagggagtt ctcgtgccgt tcttgaatag

30

<210> 80

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<400> 80

Leu Glu Leu Arg Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala

1

5

10

<210> 81

<211> 41

<212> DNA

<213> artificial

<400> 81

actagaactc cgtttgctg ccgcagcggc tgcataatga g

41

<210> 82

<211> 45

<212> DNA

<213> artificial

<400> 82

tcgactcatt atgcagccgc tgcggcagcc aaacggagtt ctagt

45

<210> 83

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

<400> 83

Asp Leu Glu Leu Arg Leu

1

5

<210> 84

<211> 26

<212> DNA

<213> artificial

<400> 84

agatctagaa ctccgtttgt aatgag

26

<210> 85

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial

<400> 85

tcgactcatt acaaacggag ttctagatct

30

<210> 86

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial

<400> 86

Leu Asp Leu Gln Leu Arg Leu Gly Tyr Tyr

1 5 10

<210> 87

<211> 38

<212> DNA

<213> artificial

<400> 87

actggatcta caactccgtt tgggttatta ctaatgag 38

<210> 88

<211> 41

<212> DNA

<213> artificial

<400> 88

tcgactcatt agtaataacc caaacggagt tgtagatcca g 41

<210> 89

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

<400> 89

Leu Asp Leu Glu Leu Arg Leu

1 5

<210> 90

<211> 29

<212> DNA

<213> artificial

<400> 90

actggatcta gaactccggtt tgtaatgag

29

<210> 91

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial

<400> 91

tcgactcatt acaaacggag ttctagatcc agt

33

<210> 92

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<400> 92

Leu Asp Leu Glu Leu Ala Ala Ala Ala Ala

1

5

10

<210> 93

<211> 41

<212> DNA

<213> artificial

<400> 93

actggatcta gaactcgctg ccgcagcggc tgcataatga g

41

<210> 94

<211> 45

<212> DNA

<213> artificial

<400> 94

tcgactcatt atgcagccgc tgcggcagcg agttctagat ccagt

45

<210> 95

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial

<400> 95

Leu Asp Leu Glu Leu Arg Leu Ala Ala Ala

1

5

10

<210> 96

<211> 38

<212> DNA

<213> artificial

<400> 96

actggatcta gaactccgtt tggctgccgc ataattgag

38

<210> 97

<211> 42

<212> DNA

<213> artificial

<400> 97

tcgactcatt atgcggcagc caaacggagt tctagatcca gt

42

<210> 98

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<400> 98

Leu Glu Leu Asp Leu Ala Ala Ala Ala Ala

1

5

10



<210> 99

<211> 38

<212> DNA

<213> artificial

<400> 99

ccttgagctt gatcttgctg ctgctgctgc tgcttgag 38

<210> 100

<211> 42

<212> DNA

<213> artificial

<400> 100

tcgactcaag cagcagcagc agcagcaaga tcaagctcaa gg 42

<210> 101

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<400> 101

Leu Asp Leu Glu Leu Arg Leu Gly

1

5

<210> 102

<211> 26

<212> DNA

<213> artificial

<400> 102

cctggatcta gaactccgtg gttaag 26

<210> 103

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial

<400> 103

tcgacttaac cacggagttc tagatccagg

30

<210> 104

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

<400> 104

Leu Glu Leu Arg Leu

1

5

<210> 105

<211> 23

<212> DNA

<213> artificial

<400> 105

tctagaactc cgtttgtaat gag

23

<210> 106

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial

<400> 106

tcgactcatt acaaacggag ttctaga

27

<210> 107

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<400> 107

Phe Asp Leu Asn Phe Ala Pro Leu Asp Cys Val

1

5

10

<210> 108

<211> 38

<212> DNA

<213> artificial

<400> 108

attcgatctt aattttgcac cgttggattg tgtttaag

38

<210> 109

<211> 45

<212> DNA

<213> artificial

<400> 109

tcgactcatt aaacacaatc caacggtgca aaattaagat cgaat

45

<210> 110

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial

<400> 110

Phe Asp Leu Asn Ile Phe Pro Pro Ile Pro Glu Phe

1

5

10

<210> 111

<211> 38

<212> DNA

<213> artificial

<400> 111

gtttgacctc aacatccctc cgatccctga attctaag

38

<210> 112

<211> 42

<212> DNA

<213> artificial

<400> 112

tcgacttaga attcagggat cggagggatg ttgaggtaa ac

42

<210> 113

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

<400> 113

Phe Gln Phe Asp Leu Asn Phe Pro Pro Leu Asp Cys Val

1

5

10

<210> 114

<211> 44

<212> DNA

<213> artificial

<400> 114

ctttcaattc gatcttaatt ttccaccgtt ggattgtgtt taag

44

<210> 115

<211> 48

<212> DNA

<213> artificial

<400> 115

tcgacttaaa cacaatccaa cgggtggaaaa ttaagatcga attgaaag

48

<210> 116

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

<400> 116

Asp Leu Asp Leu Arg Leu

5

<210> 117

<211> 29

<212> DNA

<213> artificial

<400> 117

actggatcta gatctccggt tgtaatgag

29

<210> 118

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial

<400> 118

tcgactcatt acaaacggag atctagatcc agt

33

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/JP02/13443

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K7/06, C07K7/08, C12N15/29, A01H1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K7/06, C07K7/08, C12N15/29, A01H1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PIR/SwissProt/GeneSeq, BIOSIS, WPI

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Masaru OHTA et al., "Repression Domains of Class II ERF Transcriptional Repressors Share an Essential Motif for Active Repression", The Plant Cell, Vol.13, pages 1959 to 1968, (August, 2001)	1, 6, 11-16
X	JP 2001-269176 A (Director General of National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 02 October, 2001 (02.10.01), (Family: none)	1, 6, 11-16
X	JP 2001-292777 A (Director General of National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 23 October, 2001 (23.10.01), (Family: none)	1, 6, 11-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
20 March, 2003 (20.03.03)

Date of mailing of the international search report  
01 April, 2003 (01.04.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP02/13443

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2001-269178 A (Director General of National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 02 October, 2001 (02.10.01), (Family: none)	1, 6, 11-16

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
(See extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
Claims 1, 6 and 11 to 16 relating to a peptide having the amino acid sequence represented by the formula (I) as set forth in claim 1.

**Remark on Protest** ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



Continuation of Box No.II of continuation of first sheet (1)

As the applicant approves in the description, there had been publicly known substances comparable in function to the peptide or protein according to the invention. Thus, the "special technical feature" of claims 1, 2, 4 (or 3) and 5 resides in respective amino acid sequences per se. Since the amino acid sequences as set forth in claims 1, 2, 4 (or 3) and 5 are different from each other, it does not appear that there is a technical relationship among the inventions as set forth in claims 1, 2, 4 (or 3) and 5 involving one or more of the same or corresponding special technical features. Such being the case, these groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

Thus, it is recognized that the present application has 4 groups of inventions as will be shown below.

(1) Claims 1, 6 and 11 to 16 relating to a peptide having the amino acid sequence represented by the formula (I) as set forth in claim 1.

(2) Claims 2, 7 and 11 to 16 relating to a peptide having the amino acid sequence represented by the formula (II) as set forth in claim 2.

(3) Claims 3, 4, 8, 9 and 11 to 16 relating to a peptide having the amino acid sequence as set forth in claim 4 and a peptide having the amino acid sequence represented by the formula (III) as set forth in claim 3 which contains the above amino acid sequence.

(4) Claims 5 and 10 to 16 relating to a protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:31 or SEQ ID NO:61 which is a partial sequence thereof.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> C07K 7/06, C07K 7/08, C12N 15/29, A01H 1/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> C07K 7/06, C07K 7/08, C12N 15/29, A01H 1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
PIR/SwissProt/GenSeq, BIOSIS, WPI

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Masaru Ohta et al. 「Repression Domains of Class II ERF Transcriptional Repressors Share an Essential Motif for Active Repression」 The Plant Cell, Vol. 13, P. 1959-1968 (Aug. 2001)	1, 6, 11-16
X	JP 2001-269176 A (経済産業省産業技術総合研究所長) 2001. 10. 02 (ファミリーなし)	1, 6, 11-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 20.03.03

国際調査報告の発送日 01.04.03

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
新見 浩一

4B 9162

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2001-292777 A (経済産業省産業技術総合研究所長) 2001. 10. 23 (ファミリーなし)	1, 6, 11-16
X	JP 2001-269178 A (経済産業省産業技術総合研究所長) 2001. 10. 02 (ファミリーなし)	1, 6, 11-16

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

## 特別頁参照

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1の式(I)で表されるアミノ酸配列を有するペプチドに関する請求の範囲1, 6, 11-16

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

本願におけるペプチドやタンパク質と同様の機能を有する物質は、明細書において出願人も認めているように公知である。してみれば、請求の範囲 1, 2, 4 (又は 3), 5 の「特別な技術的特徴」は、それぞれのアミノ酸配列そのものということになる。そして、請求の範囲 1, 2, 4 (又は 3), 5 に記載された各アミノ酸配列はそれぞれ別個のものであるから、請求の範囲 1, 2, 4 (又は 3), 5 の発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

本願においては、

- (1) 請求の範囲 1 の式(I)で表されるアミノ酸配列を有するペプチドに関する請求の範囲 1, 6, 11-16
- (2) 請求の範囲 2 の式(II)で表されるアミノ酸配列を有するペプチドに関する請求の範囲 2, 7, 11-16
- (3) 請求の範囲 4 に記載のアミノ酸配列を有するペプチド、及び、当該アミノ酸配列を含む請求の範囲 3 の式(III)で表されるアミノ酸配列を有するペプチドに関する請求の範囲 3, 4, 8, 9, 11-16
- (4) 配列番号 31 又はその部分配列である配列番号 61 のアミノ酸配列を有するタンパク質に関する請求の範囲 5, 10-16

がそれぞれ 1 発明と認められるから、発明の数は 4 である。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**